



Chagatest

ELISA lisado

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi*

SIGNIFICACION CLINICA

La enfermedad de Chagas es una infección parasitaria producida por el *Trypanosoma cruzi*. El diagnóstico de laboratorio depende del estadio en el cual se encuentre la enfermedad. Durante la fase aguda, se efectúa directamente mediante la comprobación de los parásitos en sangre o por métodos inmunológicos que detecten IgM. Durante la fase crónica, se pueden usar métodos inmunológicos como: hemaglutinación, inmunofluorescencia, ensayo inmunoenzimático o Western blot.

FUNDAMENTOS DEL METODO

Chagatest ELISA lisado es un ensayo inmunoenzimático "in vitro" para la detección cualitativa de anticuerpos anti-*T. cruzi* en muestras de suero o plasma humano.

La muestra se diluye en la policubeta, cuyos pocillos se encuentran sensibilizados con antígenos de *T. cruzi*, correspondientes a zonas altamente conservadas entre distintas cepas. Si la muestra contiene anticuerpos específicos, éstos formarán un complejo con los antígenos y permanecerán unidos a la fase sólida. La fracción no unida se elimina por lavado y luego se agrega el conjugado (anticuerpo monoclonal anti-IgG humana conjugado con peroxidasa), el cual reacciona específicamente con los anticuerpos anti-*T. cruzi* inmunocapturados. El conjugado no unido se elimina por lavado. La presencia de peroxidasa unida al complejo se revela mediante el agregado del sustrato cromogénico, tetrametilbencidina. Las muestras reactivas desarrollan color celeste. La reacción enzimática se detiene mediante el agregado de ácido sulfúrico, produciendo un viraje del color celeste al amarillo. La densidad óptica se mide en forma bicromática a 450/620-650 nm o a 450 nm.

REACTIVOS PROVISTOS

Policubeta sensibilizada: policubeta de tiras removibles, con 96 pocillos recubiertos con antígenos de *T. cruzi*.

Diluyente de Muestra: buffer salino con tensioactivo. Color violeta.

Conjugado Concentrado: anticuerpo monoclonal anti-IgG humana conjugado con peroxidasa (10x). Color rojo.

Diluyente de Conjugado: buffer salino con proteínas.

Revelador: solución de tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno.

Stopper: ácido sulfúrico 2 N.

Buffer de Lavado Concentrado: buffer salino con tensioactivo (25x). Color verde.

Control Positivo: suero humano inactivado conteniendo anticuerpos anti-*T. cruzi*. Color naranja.

Control Negativo: suero humano no reactivo inactivado. Color amarillo.

REACTIVOS NO PROVISTOS

Agua destilada o desionizada

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Micropipetas para medir los volúmenes indicados
- Tips descartables
- Material volumétrico para preparar las diluciones indicadas
- Estufa a 37°C
- Papel absorbente
- Guantes descartables
- Reloj alarma o cronómetro
- Hipoclorito de sodio
- Sistema de lavado de policubetas (manual o automático)
- Espectrofotómetro para lectura de policubetas

PRECAUCIONES

- Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro".
- Todas las muestras de pacientes deben manipularse como si fueran capaces de transmitir infección.
- Los sueros controles han sido examinados para antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg) y anticuerpos contra el virus de inmunodeficiencia humana (HIV) y hepatitis C (HCV), encontrándose no reactivos. Sin embargo, se recomienda manipularlos con las precauciones requeridas para muestras potencialmente infecciosas.
- Al descartar los materiales empleados en el ensayo se deben tratar a fin de asegurar la inactivación de agentes patógenos. El método recomendado para este procedimiento es autoclavar durante 1 hora a 121°C. Los líquidos de desecho pueden ser desinfectados con hipoclorito de sodio (concentración final 5%) durante por lo menos 60 minutos.
- No intercambiar reactivos de distintos lotes.
- No emplear reactivos de otro origen.
- Evitar tocar las paredes de los pocillos con los tips.
- No utilizar elementos metálicos que puedan entrar en contacto con los reactivos.
- Las policubetas deben incubarse en estufa. Debe evitarse abrir la estufa durante este proceso. No usar baño de agua.
- Evitar que los vapores de hipoclorito provenientes de los recipientes para desechos biológicos u otras fuentes entren en contacto con los reactivos, ya que el hipoclorito afecta la reacción.
- Evitar contacto del ácido sulfúrico (Stopper) con piel y mucosas. Si esto ocurre enjuagar con abundante agua. H315 + H320: Provoca irritación cutánea y ocular. H314:

Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. P262: Evitar el contacto con los ojos, la piel o la ropa. P305 + P351 + P338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir enjuagando. P302 + P352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes. P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

- Evitar el derrame de líquidos y formación de aerosoles.
- No pipetear con la boca. Usar guantes descartables y protección en los ojos durante la manipulación de las muestras y reactivos del ensayo.
- Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa vigente.

PREPARACION DE LOS REACTIVOS

Es importante que todo el material utilizado para la preparación de los reactivos esté limpio y libre de detergente e hipoclorito. **Buffer de Lavado:** a baja temperatura los componentes del reactivo concentrado pueden precipitar. En tal caso, llevar la solución a 37°C hasta disolución completa. Para la obtención del buffer de lavado listo para usar, diluir una parte de Buffer de Lavado Concentrado (25x) con 24 partes de agua destilada o desionizada. Ej.: 20 ml con 480 ml para una policubeta.

Conjugado: diluir una parte de Conjugado Concentrado (10x) con 9 partes de Diluyente de Conjugado (ej.: ver tabla siguiente con volumen requerido de Conjugado Concentrado y Diluyente de Conjugado):

Nº de pocillos	Conjugado Concentrado	Diluyente de Conjugado
8	100 ul	0,9 ml
16	200 ul	1,8 ml
24	300 ul	2,7 ml
32	400 ul	3,6 ml
96	1200 ul	10,8 ml

Policubeta sensibilizada, Diluyente de Muestra, Diluyente de Conjugado, Revelador, Stopper, Control Positivo y Control Negativo: listos para usar.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Los Reactivos Provisos son estables en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja. No congelar.

Buffer de Lavado Concentrado y Stopper: se pueden conservar a temperatura entre 2 y 25°C.

Buffer de lavado: una vez diluido es estable 3 meses a temperatura entre 2 y 25°C.

Conjugado: una vez diluido es estable 6 horas a temperatura entre 2 y 25°C.

Policubeta sensibilizada: no abrir el sobre hasta el momento de usar, ni antes que haya tomado temperatura ambiente, de lo contrario se favorecerá la condensación de humedad sobre la superficie de los pocillos. Las tiras no utilizadas deben conservarse entre 2-10°C dentro del sobre

con desecante bien cerrado. Las tiras conservadas en estas condiciones pueden ser utilizadas dentro de los 4 meses posteriores mientras no supere la fecha de vencimiento indicada en la caja.

MUESTRA

Suero o plasma

a) Recolección de muestra: obtener de la manera habitual.

b) Aditivos: no se requieren para suero. Para las muestras de plasma se puede emplear heparina, citrato o EDTA como anticoagulante.

c) Sustancias Interferentes conocidas: no se observa interferencia por bilirrubina hasta 21 mg/dl de bilirrubina, ácido ascórbico hasta 50 mg/dl, triglicéridos hasta 1500 mg/dl o hemoglobina hasta 300 mg/dl. Las muestras conteniendo partículas deberán clarificarse mediante centrifugación.

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: la muestra se debe conservar refrigerada (2-10°C). En caso de no realizar el análisis dentro de las 72 horas se debe congelar a -20°C. No es recomendable realizar múltiples ciclos de congelamiento y descongelamiento, ya que puede generar resultados erróneos. En caso de utilizar muestras congeladas, éstas deben ser homogeneizadas y centrifugadas antes de su uso.

La inactivación por calor puede afectar el resultado.

No utilizar muestras con contaminación microbiana.

Si las muestras deben ser transportadas, embalarlas de acuerdo a las especificaciones legales relativas al envío de material infeccioso.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1- Llevar a temperatura ambiente los reactivos y las muestras antes de iniciar la prueba.

2- Preparar el volumen necesario de buffer de lavado (1x).

3- Colocar en el soporte de tiras, el número de pocillos requeridos para la cantidad de determinaciones a realizar, incluyendo 2 pocillos para el Control Positivo (CP) y 3 para el Control Negativo (CN).

4- Dispensar el Diluyente de Muestra, luego la muestra (M) y los controles según el siguiente esquema:

	M	CP	CN
Diluyente de Muestra	100 ul	100 ul	100 ul
Control Positivo	-	20 ul	-
Control Negativo	-	-	20 ul
Muestra	20 ul	-	-

Homogeneizar mezclando 2-3 veces por carga y descarga de la micropipeta. Al adicionar la muestra, el Diluyente de Muestra virará de color, de acuerdo a la tabla siguiente:

Tipo de muestra	Sin muestra	Suero o plasma	Control Positivo	Control Negativo
Color	Violeta	Celeste	Naranja oscuro	Verde

Se puede verificar la dispensación de controles o muestras a los pocillos visualmente o mediante lectura espectrofotométrica (a 610/650 nm).

Advertencia: las muestras hemolizadas, ictericas o turbias pueden alterar el color final sin afectar los resultados. El viraje de color puede depender del volumen de muestra adicionado y de su composición. Un viraje de color de menor intensidad puede deberse a que se dispensó un volumen inferior de muestra, a que la muestra no se encuentra en las condiciones adecuadas, o a que tiene un bajo nivel de proteínas.

5- Para evitar la evaporación, cubrir la placa con la cinta autoadhesiva provista, e incubar 30 ± 2 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. En forma paralela, preparar el conjugado diluido (ver Tabla en PREPARACION DE LOS REACTIVOS).

6- Después de la incubación eliminar el líquido de cada pocillo por completo. Lavar 5 veces según instrucción de lavado (ver PROCEDIMIENTO DE LAVADO).

7- Agregar el Conjugado:

Conjugado diluido	100 ul	100 ul	100 ul
--------------------------	--------	--------	--------

Para evitar la evaporación cubrir la policubeta con cinta autoadhesiva.

8- Incubar 30 ± 2 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

9- Lavar 5 veces según instrucción de lavado.

10- Dispensar el Revelador. Para ello, trasvasar a un recipiente limpio solamente el volumen de Revelador que se requiera. No devolver el Revelador restante al frasco original. Evitar el contacto del reactivo con agentes oxidantes.

Revelador	100 ul	100 ul	100 ul
------------------	--------	--------	--------

11- Incubar 30 ± 2 minutos a temperatura ambiente ($18-25^\circ\text{C}$), protegido de la luz.

12- Agregar el Stopper:

Stopper	100 ul	100 ul	100 ul
----------------	--------	--------	--------

13- Leer absorbancia en espectrofotómetro en forma bicromática a 450/620-650 nm o a 450 nm.

Nota: se recomienda efectuar siempre la lectura en forma bicromática. En caso de que la lectura sea monocromática, realizar un blanco de reactivos que luego deberá ser restado de todos los valores de las muestras.

ESTABILIDAD DE LA MEZCLA DE REACCION FINAL

El color de la reacción es estable durante 10 minutos, por lo que los resultados deben leerse dentro de ese lapso.

PROCEDIMIENTO DE LAVADO

Eliminar el líquido de los pocillos por aspirado o volcado. Los pocillos se lavan con 300 ul de buffer de lavado diluido. Asegurar que la altura alcanzada al llenar los pocillos no cause desbordes.

La solución de lavado debe estar en contacto con los pocillos entre 30 y 60 segundos.

Garantizar que luego del último lavado no quede líquido residual. Realice un doble aspirado para eliminar el excedente de buffer. Si persiste luego de este procedimiento, invertir la placa sobre papel absorbente y golpearla varias veces, de lo contrario podrán obtenerse resultados erróneos.

Nota: el procedimiento de lavado es crítico para el resultado del ensayo. Si queda buffer de lavado en los pocillos o si los mismos no están completamente llenos se obtendrán resultados erróneos. No dejar que los pocillos se sequen durante el procedimiento. Los lavadores automáticos deben ser enjuagados con agua destilada o desionizada al final del día para evitar obstrucciones debido a las sales presentes en el buffer de lavado.

RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO

ETAPA	PROCEDIMIENTO	PRECAUCION/OBSERVACIONES
Dilución	Preparación de la solución de lavado (1x)	Disolución de los cristales de sales
Diluyente de Muestra	Agregar 100 ul de Diluyente de Muestra en cada pocillo	
Muestras	Agregar 20 ul de M, CP y CN	Se observa cambio de color al agregar la muestra y los controles
Incubación	Cubrir los pocillos e incubar durante 30 ± 2 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$	En estufa
Lavado	Lavar cada pocillo con 300 ul de buffer de lavado (5 veces)	Tiempo de contacto de la solución de lavado entre 30 y 60 segundos. Eliminar completamente el líquido residual de los pocillos
Dilución	Preparación del conjugado (1x)	Durante la incubación con la muestra, diluir Conjugado Concentrado (10x)
Conjugado	Agregar 100 ul de Conjugado diluido	

Incubación	Cubrir los pocillos e incubar durante 30 ± 2 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$	En estufa
Lavado	Idem al lavado anterior	
Revelado	Agregar 100 ul de Revelador	Trasvasar el volumen necesario de Revelador a usar. No pipetear del frasco original. Descartar remanente del reactivo. Evitar contacto con agentes oxidantes. No exponer a la luz
Incubación	Durante 30 ± 2 minutos entre $18-25^\circ\text{C}$	Mantener los pocillos protegidos de la luz
Detención	Agregar 100 ul de Stopper	
Lectura	Leer en espectrofotómetro	Leer dentro de los 10 minutos

CRITERIOS DE VALIDACION DEL ENSAYO

El ensayo se considera válido si se cumplen simultáneamente las siguientes condiciones:

1- El promedio de las absorbancias de los Controles Negativos deben ser menor o igual a 0,100.

Ejemplo:

Lectura 1 = 0,034; Lectura 2 = 0,028; Lectura 3 = 0,029

Promedio = $(0,034 + 0,028 + 0,029) / 3 = 0,030$

2- Eliminar cualquier Control Negativo con D.O. mayor a 0,100.

3- Si se ha eliminado algún Control Negativo, volver a calcular el promedio de los Controles Negativos. Un ensayo es válido si se aceptan al menos dos de los Controles Negativos.

4- El promedio de las absorbancias de los Controles Positivos debe ser mayor o igual a 1,300.

Ejemplo:

Lectura 1 = 1,697; Lectura 2 = 1,774

Promedio = $(1,697 + 1,774) / 2 = 1,736$

5- La diferencia entre el promedio de las D.O. de los Controles Positivos y Controles Negativos debe ser mayor o igual a 1,200.

Si una de estas condiciones no se cumple, repetir el ensayo. Recordar que las lecturas obtenidas dependerán de la sensibilidad del aparato empleado.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

a) Con instrumental óptico

La presencia o ausencia de anticuerpos anti-*T.cruzi* se determina relacionando la absorbancia de la muestra respecto al valor del Cut-off.

Cut-off = CN + 0,200

CN: promedio de las D.O. del Control Negativo

Ejemplo: $0,030 + 0,200 = 0,230$

Muestras No Reactivas: se consideran aquellas con absorbancias menores al Cut-off

Muestras Reactivas: se consideran aquellas con absorbancias mayores o iguales al Cut-off.

b) Interpretación visual

Si se opta por este tipo de interpretación, debe considerarse No Reactiva toda muestra que no presente una coloración

mayor que la de los Controles Negativos. Por el contrario, una muestra netamente amarilla se considera Reactiva.

Toda muestra inicialmente reactiva debe ser repetida por duplicado. Si una o ambas repeticiones dan reactivas, la misma debe considerarse reactiva.

Una muestra inicialmente reactiva puede ser no reactiva en las dos repeticiones. Esto puede deberse a:

- Contaminación cruzada de un pocillo no reactivo por una muestra reactiva.
- Contaminación de la muestra durante la dispensación, imprecisión en el dispensado de muestra, Conjugado y/o Revelador en el pocillo.
- Reutilización de tips.
- Contaminación del pocillo con hipoclorito u otros agentes oxidantes.

En ciertos casos una muestra no reactiva puede presentar una reacción falsamente reactiva, tanto en el análisis inicial como en sus repeticiones. Algunas causas de este fenómeno pueden ser:

- Contaminación de la muestra durante la extracción, procesamiento o conservación.
- Presencia de sustancias interferentes, tales como autoanticuerpos, fármacos, etc.
- Dispensación y/o aspirado ineficiente de la solución de lavado (sistema obstruido).

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias Interferentes conocidas en Muestra.

No se debe utilizar pool de muestras.

No se deben utilizar otros fluidos corporales como la saliva, líquido cefalorraquídeo u orina.

Cualquier resultado Reactivo debe ser verificado por otra técnica. Recordar el criterio recomendado por el Instituto Fátala Chabén, según el cual el inmunodiagnóstico de la infección deberá hacerse con un mínimo de 2 de los siguientes métodos: inmunofluorescencia indirecta, hemaglutinación indirecta y ELISA, debidamente validados por el Centro Nacional de Referencia.

CARACTERISTICAS ESPECIFICAS DE PERFORMANCE

a) Sensibilidad

- Sensibilidad clínica en Paneles de Performance: en un estudio realizado sobre diferentes paneles comerciales

internacionales, se obtuvieron los siguientes resultados:
 PMT 201 (Anti-*T. cruzi* Performance Panel, BBI, USA): se detectaron 14 de las 14 muestras reactivas.
 PMT 202 (Anti-*T. cruzi* Performance Panel, BBI, USA): se detectaron 14 de las 14 muestras reactivas.
 PP 0409 (Panel de Performance para Chagas, Q Panel, Brasil): se detectaron 16 de las 16 muestras reactivas.
 PP 0508 (Panel de Performance anti-*T. cruzi*, Q Panel, Brasil): se detectaron 16 de las 16 muestras reactivas.

- Sensibilidad clínica en Paneles de muestras reactivas anti-*T. cruzi*: en un estudio realizado sobre 85 muestras de niños, provenientes de región endémica, con infección por *T. cruzi* confirmada por diferentes métodos, se encontraron reactivas la totalidad de las muestras con el kit **Chagatest ELISA lisado**.

En un estudio de 89 muestras reactivas provenientes de una institución hospitalaria, se detectaron todas las muestras.

b) Especificidad

En un estudio de 739 muestras de sueros y plasmas de dos centros de salud diferentes, se encontró una especificidad de 99,29%.

En otro estudio realizado sobre 251 muestras de sueros y plasmas de banco de sangre, la especificidad obtenida fue de 99,60%.

Se estudió la posible aparición de reactividades cruzadas ensayando muestras provenientes de 341 individuos con diferentes condiciones clínicas que pueden ser causantes de reacciones inespecíficas para el ensayo Chagatest ELISA lisado. Estas condiciones incluyen mujeres embarazadas, pacientes hemodializados y pacientes con enfermedades autoinmunes o enfermedades infecciosas diferentes a Chagas (HIV, HTLV, hepatitis C, hepatitis B, sífilis, otras). Para esta población la especificidad fue de 99,04%.

c) Precisión

Se evaluó la precisión del test siguiendo el protocolo EP15-A recomendado por la NCCLS. Los ensayos fueron realizados con muestras de diferentes niveles de reactividad y con los controles. Se realizó 1 ensayo diario evaluando cada muestra por cuadruplicado en el transcurso de 5 días.

	Media (D.O.)	Intra-ensayo		Total	
		D.S.	C.V.	D.S.	C.V.
Muestra 1	0,590	0,021	3,54%	0,041	6,92%
Muestra 2	0,993	0,043	4,34%	0,067	6,72%
Control (+)	2,255	0,062	2,76%	0,087	3,86%
Control (-)	0,025	0,001	4,88%	0,002	7,38%

n = 20

PRESENTACION

- 96 determinaciones (Cód. 1293096).
- 192 determinaciones (Cód. 1293192).

BIBLIOGRAFIA

- Engvall, E. and Perlmann, P. - Immunochem. 8:871-74 (1971).
- Berning, H. - Dtsch. Med. Wscho 108/3:106 (1984).
- Rojkin, L.F.; Knecher, L.M.; Capriotti, G.A.; Lorenzo, L.E. -

Proceedings of the 5th. National Forum on AIDS, Hepatitis and Other blood-borne diseases, pág. 89 - Atlanta, Georgia. 29 marzo-1 abril, 1992.

- Lorenzo, L.; Capriotti, G.; Rojkin, F. - Rev. Arg. de Transfusión XVIII/1:51 (1991).
- Knecher, L.M.; Rojkin, L.F.; Capriotti, G.A.; Lorenzo, L.E.- Int. J. Parasitol. 24/2: 207-211 (1994).
- Knecher, L.M.; Capriotti, G.A.; Rojkin, L.F.; Lorenzo, L.E. - Rev. Asoc. Bioq. Arg. 58/3:125, 1994.
- Schujman, L.; Suita, G.; Acebal, S.; Albrecht, A. - Acta Bioq. Clin. Latinoam. XXIX/4:517, 1995.
- Ministerio de Salud y Acción Social, Instituto Nacional de Parasitología "Doctor Mario Fatala Chabén" - Normas para el diagnóstico de la infección chagásica - Resolución ministerial 523/97, 1998.
- Clinical Evaluation of Immunoassays. Approved Guideline I/LA21-A (2002) National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Interference testing in Clinical Chemistry. Approved Guideline EP7-A (2002) National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- User Demonstration of Performance for Precision and Accuracy - Approved Guideline EP15-A (2001).

EXPLICACION DE LOS SIMBOLOS

Policubeta **Sensib.**

Policubeta sensibilizada

Diluyente **Muestra**

Diluyente de Muestra

Conjugado **Conc.**

Conjugado Concentrado

Conjugado **Diluy.**

Diluyente de Conjugado

Revelador

Revelador

Buf. Lavado **Conc.**

Buffer de Lavado Concentrado

Control **+**

Control Positivo

Control **-**

Control Negativo

Stopper

Stopper

Los siguientes símbolos se utilizan en todos los kits de reactivos para diagnóstico de Wiener lab.



Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro"

EC **REP** Representante autorizado en la Comunidad Europea

IVD Uso diagnóstico "in vitro"



Contenido suficiente para <n> ensayos



Fecha de caducidad



Límite de temperatura (conservar a)



No congelar



Riesgo biológico



Volumen después de la reconstitución

Cont. Contenido

LOT Número de lote



Elaborado por:



Nocivo



Corrosivo / Cáustico



Irritante



Consultar instrucciones de uso


Calibr. Calibrador

CONTROL Control

CONTROL + Control Positivo

CONTROL - Control Negativo

REF Número de catálogo

 Wiener Laboratorios S.A.I.C.
Riobamba 2944
2000 - Rosario - Argentina
<http://www.wiener-lab.com.ar>
Dir. Téc.: Viviana E. Cétola
Bioquímica
Producto Autorizado A.N.M.A.T.
Cert. N°: 6655/11



Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina