Chagatest

ELISA recombinante v.3.0

Método de 3ª generación para la detección de anticuerpos contra el *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: reacción de fijación de complemento, aglutinación de látex, floculación, hemaglutinación, aglutinación directa, inmunofluorescencia o ELISA.

FUNDAMENTOS DEL METODO

En esta técnica cualitativa para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi*, la muestra se diluye en el soporte en el que se encuentran inmovilizados antígenos recombinantes (1, 2, 13, 30, 36 y SAPA), obteniéndose un método de 3ª generación. Estos antígenos se obtienen por técnica de ADN recombinante a partir de proteínas específicas de los estadios epimastigote y tripomastigote del *T. cruzi*, correspondientes a zonas altamente conservadas entre distintas cepas. La tecnología empleada permite asegurar una mezcla antigénica de composición conocida y constante lote a lote, brindando resultados reproducibles, específicos y con una elevada sensibilidad. Si la muestra contiene los anticuerpos específicos, éstos formarán un complejo con los antígenos y permanecerán unidos al soporte. La fracción no unida se elimina por lavado tras lo que se agregan anticuerpos anti- inmunoglobulina humana conjugados con peroxidasa. Si se produjo la reacción en la primera etapa del proceso, se unirá el conjugado. Luego de un nuevo lavado se agrega el sustrato enzimático. En los casos en que se haya unido el conjugado habrá aparición de color celeste. La reacción se detiene con ácido sulfúrico, con lo que el color celeste vira al amarillo.

REACTIVOS PROVISTOS

Policubeta sensibilizada: policubeta de tiras removibles con pocillos que contienen antígenos recombinantes de *T. cruzi* inmovilizados.
Conjugado: anti-inmunoglobulinas humanas (cabra) conjugadas con peroxidasa.
Revelador A: peróxido de hidrógeno 60 mmol/l en buffer citrato 50 mmol/l pH 3,2.
Revelador B: tetrametilbencidina (TMB) 0,01 mol/l en ácido clorhídrico 0,1 N.
Stopper: ácido sulfúrico 2 N.
Buffer de Lavado concentrado: cloruro de sodio 1,4 mol/l en buffer fosfatos 100 mmol/l y tensioactivo no iónico 0,1 g/l.
Diluyente de Muestras: albúmina bovina en solución fisiológica tamponada con buffer fosfatos pH 7,2.
Control Positivo: dilución de suero inactivado conteniendo anticuerpos contra el *Trypanosoma cruzi*.
Control Negativo: dilución de suero no reactivo, inactivado.

INSTRUCCIONES PARA SU USO

Buffer de Lavado: para usar diluir 1+4 con agua destilada (1 parte de Buffer de Lavado concentrado + 4 partes de agua destilada). A baja temperatura los componentes del reactivo pueden precipitar. En tal caso, colocar en baño de agua a 37ºC unos minutos, mezclando luego por inversión.
Policubeta sensibilizada, Conjugado, Revelador A, Revelador B, Stopper: listos para usar.
Diluyente de Muestras: listo para usar. Su color puede variar de lote a lote sin que se afecte la capacidad reaccional del mismo.
Control Positivo y Control Negativo: listos para usar.

PRECAUCIONES

- Todas las muestras de pacientes deben manipularse como si fueran capaces de transmitir infección. Los controles se encuentran inactivados. Sin embargo, deben emplearse como si se tratara de material infectivo.
- Los sueros controles han sido examinados para antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg), virus de inmunodeficiencia humana (HIV) y hepatitis C encontrándose no reactivos.
- Todos los materiales empleados en el ensayo deben ser destruidos a fin de asegurar la inactivación de agentes patógenos. El método recomendado para este procedimiento es autoclavar durante 1 hora a 121ºC. 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 equipos y lotes.
- No emplear reactivos de otro origen.
- Las policubetas deben incubarse en estufa. No usar baño de agua. Debe evitarse abrir la estufa durante este proceso.
- Evitar que los vapores de hipoclorito provenientes de los recipientes para desechos biológicos u otras fuentes entren en contacto con la policubeta, ya que el hipoclorito afecta la reacción.
- Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro".
- Evitar el contacto del ácido sulfúrico con la piel y mucosas. 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.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Los **Reactivos Provistos** son estables en refrigerador (2-10ºC) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja. No congelar.

Buffer de Lavado: estable 3 meses a temperatura ambiente.

Policubeta sensibilizada: las tiras de pocillos con antígeno inmovilizado se proveen cerradas al vacío y con desecante. No abrir el envoltorio hasta el momento de usar, ni antes que haya tomado temperatura ambiente, de lo contrario se favorecerá la humectación del contenido. Las tiras de pocillos no utilizadas deben conservarse dentro del sobre con el desecante, cerrado y a 2-10ºC. Las tiras conservadas en estas condiciones pueden ser utilizadas dentro de los 5 meses posteriores mientras no se supere la fecha de vencimiento del equipo.

MUESTRA

Suero o plasma

a) Recolección: obtener de la manera usual. No usar muestras inactivadas por calor. VER LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO.

b) Aditivos: no se requieren para suero. Si se emplea plasma puede utilizarse cualquier anticoagulante de uso corriente en la práctica transfusional.

c) Sustancias interferentes conocidas: la hemólisis, hiperlipemia y otras causas de turbiedad pueden provocar resultados erróneos. Estas muestras deben ser clarificadas por centrifugación.

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: las muestras no diluidas pueden conservarse durante 7 días a 2-10ºC. Para conservación por períodos más prolongados, deben ser congeladas a -20ºC o menos. Evitar los congelamientos y descongelamientos reiterados. Existen evidencias que muestran que los congelamientos sucesivos pueden ser causas de resultados erróneos. Si las muestras deben ser transportadas, embalar de acuerdo a las especificaciones legales relativas al envío de materiales infecciosos.

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Micropipetas capaces de medir los volúmenes indicados.
- Reloj alarma o cronómetro.
- Estufa a 37ºC
- Espectrofotómetro para lectura de policubetas (opcional).

CONDICIONES DE REACCION

- Longitud de onda primaria: 450 nm
- Longitud de onda secundaria (bicromática): 620-650 nm
- Calibración del instrumental: llevar a cero el espectrofotóme tro con Blanco de Reactivos procesándolo de la misma forma que una determinación pero omitiendo colocar Muestra.
- Tiempo de reacción: 90 minutos
- Temperatura de reacción: 37ºC y temperatura ambiente
- Volumen de muestra: 10 ul

PROCEDIMIENTO

Llevar a temperatura ambiente los reactivos y las muestras antes de iniciar la prueba. Una vez iniciado el procedimiento debe completarse sin interrupción.

Procesar simultáneamente 2 Controles Positivos (CP) 3 Negativos (CN) y los Desconocidos (D). Al depositar la muestra y/o Controles sobre el Diluyente de Muestras, debe asegurarse de colocar los mismos en el seno del líquido y no sobre las paredes o el fondo del pocillo. Enjuagar la pipeta con el Diluyente dispensado en el pocillo para asegurar la correcta homogeneización.

En los pocillos a utilizar de la policubeta colocar:

	D	CP	CN
Diluyente de Muestras	200 ul	200 ul	200 ul
Control Positivo	-	10 ul	-
Control Negativo	-	-	10 ul
Muestra	10 ul	-	-

Mezclar aplicando suaves golpes en los laterales de la policubeta durante 10 segundos una vez cargadas las muestras en cada tira. Para evitar la evaporación, cubrir la placa e incubar en la estufa 30 minutos a 37ºC. Luego aspirar cuidadosamente el líquido de cada pocillo recibiéndolo en un recipiente para desechos biológicos que contenga 5% de hipoclorito sódico. A continuación, lavar 5 veces con Buffer de Lavado empleando aproximadamente 300 ul/vez/pocillo. Después de cada lavado, el líquido se descartará también en el recipiente con hipoclorito. Opcionalmente, emplear lavador automático. Al finalizar el último lavado, eliminar por completo el líquido residual, invirtiendo la policubeta y golpeándola varias veces sobre papel absorbente, ejerciendo una leve presión con la mano sobre los laterales mayores del soporte, para evitar la caída de las tiras de pocillos. Luego agregar en cada pocillo:

Conjugado	1 gota	1 gota	1 gota

En caso de utilizar micropipeta automática, dispensar 50 ul.

Mezclar aplicando suaves golpes en los laterales de la policubeta durante 10 segundos. Para evitar la evaporación, cubrir la placa e incubar durante 30 minutos en estufa a 37ºC. Luego aspirar el líquido de los pocillos, recibiéndolo en el recipiente con hipoclorito y lavar según se indicó más arriba. Al finalizar el último lavado, eliminar por completo el líquido residual, invirtiendo la policubeta y golpeándola varias veces sobre papel absorbente, ejerciendo una leve presión con la mano sobre los laterales mayores del soporte, para evitar la caída de las tiras de pocillos. Luego agregar en cada pocillo:

Revelador A	1 gota	1 gota	1 gota

Revelador B	1 gota	1 gota	1 gota

En caso de utilizar micropipeta automática, dispensar 50 ul. Mezclar aplicando suaves golpes en los laterales de la policubeta durante 10 segundos. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente y luego agregar:

Stopper	1 gota	1 gota	1 gota

En caso de utilizar micropipeta automática, dispensar 50 ul.
Mezclar aplicando suaves golpes en los laterales de la policubeta durante 10 segundos.
Leer en espectrofotómetro a 450 nm o bicromática a 450/620-650 nm o evaluar el resultado a simple vista por comparación con los Controles Positivos y Negativos.

ESTABILIDAD DE LA MEZCLA DE REACCION FINAL
El color de la reacción es estable durante 30 minutos, por lo que los resultados deben observarse durante ese lapso.

CRITERIOS DE VALIDACION DE LA CORRIDA
La corrida se considera válida si se cumplen simultáneamente las siguientes condiciones:
a) Las lecturas de al menos 2 de los 3 Controles Negativos corregidas contra el Blanco de Reactivos deben ser menores o iguales a 0,150 D.O.
b) La lectura media de los Controles Positivos corregida debe ser mayor o igual a 0,600 D.O.
Si una o ambas condiciones no se cumple, repetir la corrida.
Para ambos casos 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 Cut-off.

Cut-off = CN + 0,300 D.O.

donde CN: promedio de las lecturas del Control Negativo
Zona de indeterminación: Cut-off ± 10%
Muestras No Reactivas: se consideran aquellas con absorbancias menores al límite inferior de la zona de indeterminación.
Muestras Reactivas: se consideran aquellas con absorbancias mayores al límite superior de la zona de indeterminación.
Muestras Indeterminadas: se consideran aquellas con absorbancias que caen dentro de la zona de indeterminación. Estas muestras deben ser ensayadas nuevamente.

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.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO
Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA.

- Constituyen causas de resultados erróneos:
  Lavado incorrecto de los pocillos de reacción. Contaminación cruzada de muestras No Reactivas con anticuerpos procedentes de una muestra Reactiva.
  Contaminación de la solución cromogénica con agentes oxidantes (cloro, etc.).
  Contaminación del Stopper.
  Conservación inadecuada de las tiras de pocillos no utilizadas.
  Utilizar baño de agua para la incubación.
  Contaminación del Buffer de Lavado diluido. Se recomienda verificar la limpieza de los recipientes donde se prepara y almacena. Si se observa aparición de turbidez o precipitado al prepararlo, debe desecharse.
- Un resultado negativo no excluye la posibilidad de exposición o infección por *T. cruzi*.
- Ocasionalmente, al efectuar lecturas bicromáticas, pueden obtenerse absorbancias negativas que no invalidan la determinación. Esto se debe a que algunas muestras dan lecturas inferiores al Blanco de Reactivos.
- Dependiendo de la sensibilidad del espectrofotómetro utilizado, se encuentran muestras que pueden dar valores por encima del rango numérico de lectura. Estos resultados deben interpretarse como reactivos. En estos casos particulares, para obtener valores numéricos, puede efectuarse la lectura a 490 nm o 490/650 nm.
- No utilizar muestras inactivadas por calor ya que pueden ocasionar resultados falsos positivos.
- Verifique que el sistema lavador que está usando (WIENER WASHER u otro) aspire totalmente el contenido de los pocillos y que el volumen de la solución lavadora dispensada sea pareja.

PERFORMANCE
a) Sensibilidad: sobre un panel de 70 muestras con xenodiagnóstico y serología positivos la sensibilidad es del 100%.
Sobre otro panel de 144 muestras con serología positiva con métodos de hemaglutinación indirecta, inmunofluorescencia indirecta y otros ELISA, la sensibilidad es del 99,3%.
b) Especificidad: sobre un panel de 75 muestras con xenodiagnóstico y serología negativos, la especificidad es del 98,7%.
Sobre otro panel de 200 muestras con serología negativa por métodos de hemaglutinación indirecta, inmunofluorescencia indirecta y otros ELISA, la especificidad es del 100%.
c) Estudio poblacional: en una población general que incluye individuos sanos, donantes, chagásicos y con otras patologías, la correlación con respecto a métodos confirmatorios, fue del 99,6%.

No obstante la sensibilidad del método, sus resultados, al igual que los de cualquier método serológico, sólo constituyen un dato auxiliar para el diagnóstico. Es por esta razón que los informes deben ser considerados en términos de probabilidad. En este caso, mayor o menor probabilidad de parasitosis por *T. cruzi*.
Cualquier resultado Reactivo debe ser verificado por otra técnica. Recordar el criterio recomendado por el Instituto Fatala Chaben, según el cual el inmunodiagnóstico de la in-

fección deberá hacerse con un mínimo de 2 de los siguientes métodos: inmunofluorescencia indirecta, hemaglutinación indirecta, ELISA, aglutinación de partículas (látex), debidamente validados por el Centro Nacional de Referencia.

PRESENTACION

Kit para 96 determinaciones (Cód. 1293254).

BIBLIOGRAFIA

- Frasch, A.; Reyes, M. - Parasitol. Today 6/4, 1990.
- Affranchino, J. et al. - Mol. Biochem. Parasitol. 34:221, 1989.
- Pastini, A.C.; Iglesias, S.R.; Carricarte, V.C.; Guerin, M.E.; Sánchez, D.O.; Frasch, A.C. - Clin. Chem. 40/10:1893, 1994.
- Iglesias, S.R. - Instituto de Investigaciones Bioqumícas "Fundación Campomar", Buenos Aires, 1991.
- Knecher, L.M.; Rojkín, L.F.; Capriotti, G.A.; Lorenzo, L.E.- Int. J. Parasitol. 24/2: 207-211 (1994).
- Knecher, L.M.; Capriotti: G.A.; Rojkín, L.F.; Lorenzo, L.E.- Rev. Asoc. Bioq. Arg. 58/3:125, 1994.
- 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.
- Capriotti, G.A.; Felcaro, M.V.; Toplikar, E.M.; Gariglio, R.C. - 52º Annual Meeting AACC, San Francisco, CA - Clin. Chem. 46/S6:A51, Abs 190A, 2000.

EXPLICACION DE LOS SIMBOLOS

Policubeta | **Sensib.**	Policubeta sensibilizada
Diluyente | **Muestra**	Diluyente de Muestra
Conjugado	Conjugado
Buf. Lavado | **Conc**	Buffer de Lavado Concentrado
Revelador | **A**	Revelador A
Revelador | **B**	Revelador B
Control | **+**	Control Positivo
Control | **-**	Control Negativo
Stopper	Stopper

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

CE	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"
Σ	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. Nº: 2872/98

Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina