

CELQUEST CHAGAS ELISA

ELISA recombinante

Ensayo Inmunoenzimático para la detección de anticuerpos **IgG** anti *Trypanosoma cruzi*

CELQUEST CHAGAS ELISA

Solamente para uso diagnóstico *in vitro*. Inmunodiagnóstico para la detección cualitativa de anticuerpos IgG dirigidos contra *Trypanosoma cruzi* en muestras de suero o plasma humano.

I) SIGNIFICADO CLINICO

La Enfermedad de Chagas es una enfermedad crónica causada por la infección con el protozoario *T. cruzi*. El parásito es transmitido a los humanos por un grupo de insectos de la familia Rodulidae, siendo la vinchuca (*Triatoma infestans*) el vector principal. La infección puede ser transmitida también de forma congénita, por transfusión sanguínea o trasplante de órganos. Esta infección afecta en grado variable diversos órganos y sistemas, especialmente el corazón y el tubo digestivo. La enfermedad es endémica desde el sur de EEUU hasta el centro de Chile y el sur de Argentina.

La respuesta inmune humoral a la infección puede ser detectada de forma rápida por CELQUEST CHAGAS ELISA. Este ensayo es adecuado para el análisis de un gran número de muestras de suero o plasma, lo que lo torna especialmente útil en Bancos de Sangre y Laboratorios Clínicos.

II) FUNDAMENTOS DEL ENSAYO

CELQUEST CHAGAS ELISA es un ensayo inmunoenzimático en fase sólida para la detección cualitativa de anticuerpos contra el *T. cruzi*. Se realiza en placas cuyos pocillos son sensibilizados con antígeno recombinantes de *T. cruzi* diseñados y desarrollado en nuestro laboratorio. Si las muestras analizadas contienen anticuerpos específicos para *T. cruzi*, estos formarán un complejo estable con los antígenos que recubren los pocillos. El material unido de forma no específica será eliminado por medio del lavado. Durante la incubación con el conjugado, los anticuerpos anti-IgG marcados con peroxidasa, se unirán al complejo formado. Finalmente en la etapa de incubación con el sustrato cromogénico, la peroxidasa unida al complejo producirá una coloración, que permitirá detectar las muestras reactivas al *T. cruzi*. La reacción enzimática será detenida por la adición de ácido sulfúrico, midiéndose posteriormente la intensidad de color con un lector colorimétrico para placas de ELISA.

1. COMPONENTES

Componentes de CELQUEST CHAGAS ELISA para 96 determinaciones.

- Una placa de ELISA para 96 determinaciones, sensibilizada con antígenos recombinantes de *T. cruzi*. Cada placa está compuesta por 12 tiras de 8 pocillos que pueden ser utilizadas individualmente y es proporcionada dentro de un embalaje herméticamente cerrado, que contiene un desecante en su interior.
- Sellos autoadhesivos para cubrir los pocillos
- Una bolsita autosellante para conservar la placa una vez abierto el embalaje herméticamente cerrado.
- Las soluciones que componen el kit son detalladas en la tabla 1.

Tabla 1

Solución	Descripción
Solución de lavado (concentrado 25x)	Frasco con 60 ml de solución tampón, pH 7.2. Contiene Tween 20
Diluyente de muestras	Frasco con 30 ml de solución tampón, pH 7.2. Contiene Tween 20, BSA y aditivos
Conjugado anti-IgG	Frasco con 15 ml de solución de conjugado Anti-IgG (cabra) marcado con peroxidasa, en buffer Tris y estabilizantes.
Sustrato	Frasco con 15 ml de Tetrametilbenzidina (TMB) y Peróxido de Hidrógeno. Es un reactivo muy sensible y no debe ser utilizado si presenta un aspecto turbio o color azul.
Control positivo	Frasco con 500 µl de suero humano chagásico.
Control negativo	Frasco con 500 µl de suero humano negativo para Chagas.
Ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄) 2N	Frasco con 10ml de solución. En caso de contacto con piel o mucosas, lave la zona afectada con abundante agua.

III) MATERIALES NECESARIOS NO INCLUIDOS EN EL KIT

- Micropipetas o pipetas multicanal
- Punteros descartables para micropipetas
- Agua destilada o deionizada
- Sistema de lavado automático de microplacas (opcional)
- Lector de microplacas con filtro para 450 nm y filtro de referencia (620 o 630 nm)(opcional)
- Estufa con temperatura regulable de 37° C.

IV) PRECAUCIONES DE USO

- Utilizar solamente para diagnóstico "*in vitro*"
- Los sueros humanos utilizados como controles mostraron resultados negativos para HTLV, Sífilis, HIV, HBV y para HCV. De todas formas se recomienda manipularlos con las precauciones de muestras potencialmente infecciosas. Ningún método conocido actualmente garantiza la ausencia de agentes infecciosos en derivados sanguíneos.
- Todos los reactivos y componentes deben estar a temperatura ambiente en el momento de ser usados y deben ser refrigerados a 2-8 grados celsius inmediatamente después de su uso.
- No abra el sobre que contiene la placa hasta que esta no haya alcanzado la temperatura ambiente. Guarde las tiras no utilizadas junto con el desecante, dentro de la bolsa plástica provista a tales efectos. Asegúrese de que la bolsa quede bien cerrada.
- Los recipientes utilizados para la preparación de los reactivos deben estar limpios y libres de detergentes o cloro.
- Use punteros nuevos para cada muestra y reactivo.
- Evite tocar las paredes del pocillo con el puntero de la pipeta.
- Nunca pipetee directamente del frasco original, coloque en otro recipiente el volumen que se va a utilizar.
- Nunca devuelva restos de reactivos no utilizados a los frascos originales.
- No mezcle reactivos provenientes de diferentes lotes.
- Siempre considere que la reproducción de resultados depende de la precisión del pipeteado, de la exactitud de los tiempos y temperaturas de incubación y del correcto lavado de los pocillos.
- No utilice objetos metálicos que puedan entrar en contacto con las soluciones.
- No utilice muestras o reactivos contaminados porque pueden producir falsos resultados.

V) PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- Use guantes cuando manipule muestras y reactivos.
- No pipetee con la boca.
- No coma, beba, fume o manipule lentes de contacto en el área de trabajo.
- Limpie y desinfecte cualquier derrame de muestras o reactivos utilizando algún desinfectante tal como hipoclorito de sodio al 0,5%.
- Evite el contacto de la solución de frenado con piel y mucosas. Si éste u otro reactivo entra en contacto con piel o mucosas, lave el área afectada con abundante agua.
- Elimine todo el material contaminado en recipientes adecuados para desechos biológicos. Éstos pueden ser decontaminados en autoclave a 121° C por una hora o tratados con hipoclorito de sodio por dos horas.
- Los restos de muestras, controles y reactivos utilizados deben ser tratados con hipoclorito de sodio al 0,5% por dos horas antes de ser eliminados.

VI) CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE

- CELQUEST CHAGAS ELISA debe ser almacenado y transportado a una temperatura de entre 2 y 8° C. **No debe ser congelado.**
- Los estudios de estabilidad demuestran que CELQUEST CHAGAS ELISA conserva su actividad inicial después de una semana a 37°C. Sin embargo se recomienda respetar las condiciones de almacenamiento descritas.

VII) PREPARACION Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

- CELQUEST CHAGAS ELISA puede ser utilizado con muestras de suero o plasma humano.
- Los anticoagulantes presentes en las muestras como EDTA, oxalato, heparina o citrato, no afectan los resultados del ensayo.

- Las muestras que contienen precipitados o coágulos deben ser centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos antes del análisis. **Advertencia:** no utilizar muestras con contaminación microbiana pues pueden producir falsos resultados. Las muestras pueden ser conservadas entre 2 y 8° C hasta una semana antes de ser analizadas. Para períodos más prolongados se puede agregar azida de sodio al 0.1% y congelarlas a -20 grados centígrados o temperaturas más bajas. No someta las muestras a ciclos repetitivos de congelamiento-descongelamiento, ya que esto afecta su estabilidad. **Advertencia:** no congele las muestras en congeladores con deshielo automático. Si utiliza muestras congeladas éstas deberán ser homogeneizadas y centrifugadas antes de su uso.

VIII) PROCEDIMIENTO

Antes de comenzar el ensayo aguarde que los reactivos alcancen temperatura ambiente.

- 1- Diluir la solución de lavado que se presenta concentrado 25 veces (25x) con agua destilada. Por ejemplo, para preparar 500 mL, medir 20 mL de solución de lavado y adicionarle 480 mL de agua. Si la solución 25X presenta cristales, éstos deben disolverse por agitación constante previo al uso de la solución.
- 2- Colocar 200 µL de diluyente de muestras en cada uno de los pocillos que serán utilizados. Incluir dos pocillos para el blanco de reacción, dos para el control positivo y dos para el control negativo.
- 3- Adicionar 10µL de suero o plasma a cada pocillo, control positivo y negativo
- 4- Sellar la placa con el sello autoadhesivo proporcionado con el kit para impedir la evaporación de los reactivos. Incubar por 30 minutos a 37° C +/- 1.
- 5- Lavar la placa con la solución de lavado diluida (1x) con aproximadamente 350 µL por pocillo. Dejar la solución de lavado aprox. 30 seg cada vez. Eliminar la solución después de cada lavado. Se recomienda lavar 5 veces con el equipo de lavado automático o lavado manual.

Protocolo recomendado para lavado automático de tiras:

Realice 5 ciclos de lavado dispensando 350µL de la solución de lavado diluida. Asegúrese que:

- a) la solución de lavado llene el pocillo.
- b) la solución de lavado no se derrame del pocillo.
- c) el tiempo de permanencia sea de 30 seg.
- d) no quede líquido remanente en el pocillo al finalizar los lavados.

Nota: Mantenga siempre el equipamiento limpio enjuagando con abundante agua destilada al final de cada jornada de trabajo. Realice un mantenimiento periódico de acuerdo a las instrucciones del proveedor. **SIEMPRE VERIFIQUE QUE EL EQUIPO NO TOQUE EL FONDO DE LOS POCILLOS YA QUE SE PUEDE AFECTAR LA REACCIÓN.**

- 6- Después del último lavado colocar la placa invertida sobre un papel absorbente y golpearla suavemente sobre dicha superficie. **No permitir que la placa se seque.**
- 7- Adicionar 100µL de conjugado en todos los pocillos.
- 8- Sellar la placa de la misma forma que en la incubación anterior e incubar nuevamente a 37° C +/- 1. Lavar la placa con la solución de lavado de la misma manera que en los pasos 5 y 6.
- 9- Revelado: adicionar 100 µL de sustrato a cada pocillo. Incubar la placa **exactamente por 30 minutos** a temperatura ambiente.
- 10- Interrumpir la reacción adicionando 50 µL de ácido sulfúrico en cada pocillo.
- 11- Medir densidad óptica a 450nm o bicromática a 450-620 a 650

IX) INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Lea la placa en el tiempo más breve posible.

Advertencia: lecturas posteriores a los 60 minutos no son confiables.

Corregir todos los valores restando el promedio de los blancos de reacción

Control de Calidad

Los resultados de un ensayo son válidos si se cumplen los siguientes criterios:

1. Promedio de los blancos debe ser menor de 0,15
2. Control negativo: absorbancia menor que 0,20 después de restar el blanco.
3. Calibrador positivo: absorbancia igual o mayor que 1,00.

En caso de que una sola de las réplicas se encuentre dentro de los parámetros aceptables, descartar la otra para realizar los cálculos

Resultados

1. Calcular el valor umbral (Cut off) según: $(CP+CN) \times 0,22 = \text{Cut off}$

2. Dividir la absorbancia de la muestra por el valor umbral.

Positivo: relación absorbancia/valor umbral $\geq 1,1$

Negativo: relación absorbancia/valor umbral $< 0,9$

Dudoso: relación absorbancia/valor umbral $\geq 0,9 < 1,1$

Interpretación de los Resultados

Una reacción positiva debe interpretarse como la presencia de anticuerpos IgG anti- *T. cruzi*.

Una reacción negativa indica que el paciente no tiene niveles detectables de anticuerpos anti- *T. cruzi*. Esto puede deberse a la ausencia de infección o a una débil respuesta inmune del paciente.

Si el resultado de la muestra es dudoso, repetir el ensayo por duplicado. Si la lectura persiste en esta zona considérela como un suero positivo.

X) LIMITACIONES DEL ENSAYO

- Todas las muestras indeterminadas o positivas deben ser repetidas en duplicado. Las muestras repetidamente reactivas pueden ser confirmadas por técnicas tales como: IFI, Western Blot, Xenodiagnóstico o PCR.
- El diagnóstico de la enfermedad de Chagas debe basarse en una combinación de resultados que incluyen la historia clínica, la detección del parásito y los ensayos serológicos posteriores.
- Las muestras con contaminación microbiana o de personas con otras parasitosis o enfermedades autoinmunes pueden producir falsos resultados.
- Un resultado negativo no excluye la posibilidad de infección con *T. cruzi*. Una respuesta inmune humoral no es detectada durante las primeras semanas después de la infección por ningún método existente en el mercado.

XI) CARACTERÍSTICAS DEL FUNCIONAMIENTO

CELQUEST CHAGAS ELISA, ha sido evaluado utilizando plasmas y sueros de distintos orígenes y ha sido comparado con otros ensayos comerciales.

- Estudio de Especificidad y Sensibilidad:** se construyó una curva ROC con un panel de 881 muestras, estableciendo sensibilidad y especificidad de 99,5 % y 100% respectivamente.
- Estudio comparativo con otros ensayos:** CELQUEST CHAGAS ELISA fue comparado con 2 ensayos comerciales. Fue analizado un panel de 207 muestras cuyos resultados son mostrados en la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados del estudio comparativo

	CELQUEST		Ensayo A		Ensayo B	
	Negativa	Positiva	Negativa	Positiva	Negativa	Positiva
Resultados	74/74	133/133	74/74	129/133	73/74	132/133
Concordancia	100%		98.1%		99.0%	

De los ensayos el A utiliza extractos de parásitos y detectan IgG.

El ensayo B utiliza antígenos recombinantes y detectan IgG.

1. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anonymous: Control of Chagas' disease. WHO Technical Report Series, World Health Organization. 811, 1991.
2. Burns Jr. JM, et al. Identification and synthesis of a major conserved antigenic epitope of *Trypanosoma cruzi*. Proc Natl Acad Sci USA 89: 1239-1243, 1992.
3. Gruber, A. and Zingales, B. *Trypanosoma cruzi*: Characterization of two recombinant antigens with potencial application in the diagnosis of Chagas Disease. Exp. Parasitol. 76:1-12, 1993.
4. Houghton RL, et al. A multi-epitope synthetic peptide and recombinant protein for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in radioimmunoprecipitation-confirmed and consensus-positive sera. J Infect Dis 179: 1226-1234, 1999.
5. Ibañez, C.F., Affranchino, J.I., Medina, R.A., Reyes, M.B., Leguizamon, S., Camargo, M.E., Aslund, L., Petteron, U. and Frasch, A.C.C. Multiple *Trypanosoma cruzi* antigens containing tandemly repeated amino acid sequence motifs. Mol. Biochem. Parasitol. 30:27-34, 1998.
6. Leiby DA, et al. *Trypanosoma cruzi* in a low - to moderate- risk blood donor population: seroprevalence and possible congenital transmission. Transfusion 39: 310-315, 1999.
7. Peralta JM, et al. Serodiagnosis of Chagas' disease by enzyme-linked immunosorbent assay using two synthetic peptides as antigens. J Clin Microbiology 32(4): 971-974, 1994.
8. Spencer, H.C., Allain, D.S., Sulzer, A.J., Collins, W.E. Evaluation of the Micro Enzyme Lynked Immunosorbent Assay for Antibodies to *Trypanosoma cruzi* Am. J. Trop. Med. Hyg., 29 (2): 179.182, 1980.
9. Moncayo, A. Chagas disease: epidemiology and prospects for interruption of transmission in the Americas. World Health Stat Q, 45:276-279, 1992.
10. Umezawa ES, et al. Evaluation of recombinant antigen for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America, J Clin Microbiol 37(5): 1554-1560, 1999.



Fabricante



Consultar las
instrucciones de
uso



Atención
Consulte las
Instrucciones de
uso



Dispositivo
médico para
diagnóstico in
vitro



Límite de
temperatura