

Sistema microelisa  
*Microelisa system*

**CHAGATEK ELISA**



B I O M É R I E U X

# CHAGATEK ELISA

Sistema microelisa

Test de selección

Solamente para uso profesional "in vitro"

## Aplicación

CHAGATEK ELISA es un enzimoimmunoensayo (Elisa) para la detección de anticuerpos anti-Trypanosoma cruzi en suero o plasma humano.

## Fundamento del método

CHAGATEK ELISA es un enzimoimmunoensayo (Elisa) en microtiras basado en el método indirecto para la detección de anticuerpos anti-T. cruzi en muestras de suero o plasma humano.

Luego de una dilución apropiada de las muestras, éstas se incuban en los pocillos de las microtiras de poliestireno, recubiertos con antígenos purificados de T.cruzi. Los anticuerpos anti-T. cruzi son específicamente capturados por los antígenos pegados en los pocillos, quedando unidos a la fase sólida. Luego del proceso de lavado para la eliminación de las inmunoglobulinas no unidas, se incuba con anticuerpos monoclonales anti-IgG humana conjugado con peroxidasa. Este conjugado reacciona específicamente con los anticuerpos anti-T. cruzi inmovilizados. El conjugado no unido se elimina por proceso de lavado y se revela la presencia de peroxidasa mediante el agregado de una mezcla de peróxido de hidrógeno y tetrametilbencidina (TMB). Esta incubación da por resultado la aparición de un color azul, cuya intensidad depende de la concentración y de la afinidad de los anticuerpos anti-T. cruzi de la muestra. La reacción enzimática se detiene mediante el agregado de ácido sulfúrico, produciendo un viraje del color azul al amarillo. El desarrollo de un color leve o nulo, indica la ausencia de niveles detectables de anti-T. cruzi en la muestra.

## Componentes

96 determinaciones    192 determinaciones

1 Soporte

2 Soportes

### Soportes de microtiras

Conteniendo 12 tiras de 8 pocillos recubiertos con antígeno purificado de T. cruzi, envasadas en sachet de polietileno metalizado con base de aluminio conteniendo sílicagel como desecante.

1 Frasco  
(0,2 ml)

1 Frasco  
(0,4 ml)

### Control positivo\*

Suero reactivo para anticuerpos anti-T. cruzi, inactivado, estabilizado, de bajo título. Material potencialmente infeccioso. Listo para usar.

1 Frasco (0,3 ml)	1 Frasco (0,6 ml)	<b>Control negativo*</b> Suero no reactivo para anticuerpos anti-T. cruzi, inactivado, estabilizado. Material potencialmente infeccioso. Listo para usar.
1 Frasco (50 ml)	1 Frasco (100 ml)	<b>Buffer de lavado concentrado 25X</b> Tampón fosfato concentrado. Diluir 1:25 con agua destilada para su uso.
1 Frasco (1,5 ml)	1 Frasco (3 ml)	<b>Conjugado concentrado 10X</b> Anticuerpo monoclonal anti-IgG humana marcado con peroxidasa, estabilizado. Diluir 1:10 para su uso con Diluyente de conjugado.
1 Frasco (6 ml)	1 Frasco (12 ml)	<b>Solución estabilizada de peróxido de hidrógeno tamponado</b> Lista para usar.
1 Frasco (6 ml)	1 Frasco (12 ml)	<b>Solución estabilizada de tetrametilbencidina (TMB)</b> Lista para usar.
1 Frasco (25 ml)	1 Frasco (50 ml)	<b>Diluyente de muestras.</b> Estabilizado. Solución salina proteica base PBS. Listo para usar. Agitar antes de usar.
1 Frasco (15 ml)	1 Frasco (30 ml)	<b>Diluyente de conjugado</b> Estabilizado. Solución proteica. Listo para usar. Agitar antes de usar.
1 Frasco (15 ml)	1 Frasco (30 ml)	<b>Ácido sulfúrico</b> Solución 1 mol/l de ácido sulfúrico en agua destilada. Listo para usar.

Los controles están preparados con suero o plasma humano no reactivo para anticuerpos contra HIV, HCV y HBsAg. Sin embargo los productos de origen humano deben manipularse con precaución.

### **Estabilidad y conservación**

Los reactivos son estables hasta la fecha que figura en la caja y los frascos. Una vez abierto el sobre que contiene las tiras de reacción, deben sacarse las necesarias para los análisis de las muestras y volver a cerrar herméticamente el sobre con las restantes, conservando el desecante en su interior.

El almacenamiento debe hacerse en heladera a una temperatura entre los 2 y 8 °C.

### **Materiales requeridos no provistos:**

- Agua destilada.

- Micropipetas de 10  $\mu$ l, 100  $\mu$ l y 200  $\mu$ l.
- Tips descartables para micropipetas.
- Papel absorbente.
- Material volumétrico de vidrio para preparar diluciones.
- Termobloque incubador BIOMÉRIEUX, alternativamente estufa o baño de agua a  $37 \pm 2$  °C.
- Lavador para microtiras BIOMÉRIEUX, o sistema equivalente.
- Como alternativa se puede efectuar el lavado manualmente.
- Fotómetro para microelisa BIOMÉRIEUX, o sistema similar equipado con filtro de 450 nm.
- Guantes desechables.
- Cronómetro.
- Solución de hipoclorito de sodio al 5% u otro desinfectante adecuado.
- Contenedor para residuos biológicamente peligrosos.
- Cinta adhesiva.

### **Precauciones y advertencias sobre su uso**

Las muestras de suero humano y los controles deben ser considerados como potenciales portadores de agentes infecciosos, por lo que se recomienda respetar las condiciones de bioseguridad para su manipuleo y procesamiento.

- No fumar, comer o beber en las áreas de trabajo, así como tampoco pipetear con la boca.
- Evitar salpicaduras sobre las áreas de trabajo, de producirse un derramamiento accidental deben desinfectarse las áreas inmediatamente empleando una solución de hipoclorito de sodio al 5%.
- No utilizar los reactivos después de la fecha de vencimiento.
- No mezclar los reactivos de diferentes lotes.
- No intercambiar las tapas de los distintos frascos.
- Dejar que los reactivos alcancen la temperatura ambiente antes de su uso.
- Para evitar la contaminación, no tocar con los dedos ni con los tips la parte superior o inferior de las tiras, o el borde de los pocillos.

### **Preparación de los reactivos**

1. *Microtiras*: Están listas para su uso y son estables hasta la fecha de caducidad indicada en el equipo, cuando se conservan entre 2 y 8 °C en su envase original, perfectamente cerrado y sin remover el desecante.
2. *Solución de lavado*: Diluir una parte del contenido del frasco de buffer de lavado concentrado 25X en 24 partes de agua destilada. La solución final así preparada es estable 15 días conservada en la heladera entre 2 y 8 °C.
3. *Conjugado*: Diluir una parte del contenido del frasco de conjugado concentrado 10X con 9 partes de diluyente de conjugado, preparar inmediatamente antes de su uso. La solución así preparada es estable 4 horas a temperatura ambiente.

### Preparación del conjugado

Tiras	Conjugado	Diluyente de Conjugado
1	100 $\mu$ l	0,9 ml
2	200 $\mu$ l	1,8 ml
3	300 $\mu$ l	2,7 ml
4	400 $\mu$ l	3,6 ml

4. *Diluyente de muestras*: Listo para usar. Agitar antes de usar.
5. *Controles Negativo y Positivo*: Listos para usar.
6. *Diluyente de conjugado*: Listo para usar. Agitar antes de usar.
7. *Peróxido de hidrógeno*. Listo para usar.
8. *TMB*: Lista para usar.

### Preparación del sustrato / TMB

Tiras	Peróxido de hidrógeno	TMB
1	0,5 ml	0,5 ml
2	1,0 ml	1,0 ml
3	1,5 ml	1,5 ml
4	2,0 ml	2,0 ml

La solución así preparada es estable por un máximo de 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad.

### Recolección y preparación de la muestra

- Puede utilizarse suero o plasma preparado con los siguientes anticoagulantes como: citrato, heparina, oxalato o EDTA.
- Extraer el suero del coágulo o el plasma de los eritrocitos tan pronto como sea posible, para evitar la hemólisis.
- Los especímenes que contengan azida sódica o partículas pueden dar resultados erróneos.
- Los especímenes con un nivel elevado de bilirrubina, hemoglobina, lípidos o proteínas no suelen afectar el resultado del test.
- Los especímenes no deben tener contaminación microbiana y pueden conservarse a 2 - 8 °C durante una semana. Los especímenes recién obtenidos pueden conservarse durante un año a -20 °C (o menos). Un ciclo de congelación/descongelación no afecta los resultados del test.

### Procedimiento

1. Colocar los pocillos necesarios para la cantidad de determinaciones a realizar, más dos controles negativos y un control positivo en el soporte de tiras.
2. Agregar a cada pocillo 200  $\mu$ l de diluyente de muestra.
3. Dispensar en los pocillos correspondientes 10  $\mu$ l de controles (2 negativos y 1 positivo) y 10  $\mu$ l de cada muestra. Homogeneizar bien por carga y descarga de la micropipeta.

- Luego aplicar sobre los pocillos movimientos circulares o pequeños golpes laterales durante 10 segundos.
4. Incubar los pocillos a 37 °C durante 20 minutos.
  5. Evitar la evaporación durante la incubación de la muestra, cubriendo las tiras con cinta adhesiva nueva. Sacar la cinta antes de lavar.
  6. Lavar las tiras siguiendo el procedimiento de lavado:
    - a) Aspirar el contenido de los pocillos y a continuación llenarlos con solución de lavado diluida (aproximadamente 300 µl) dejar 60 segundos y repetir el proceso 5 veces más hasta completar un total de 6 (seis) lavados.
    - b) Después de la última aspiración colocar los pocillos boca abajo sobre papel absorbente, golpearlos suavemente para asegurar su total escurrido.
  7. Durante la incubación preparar el conjugado siguiendo las indicaciones descritas en la preparación de reactivos. Luego del lavado, dispensar 100 µl de la solución de conjugado a cada pocillo. Homogeneizar aplicando movimientos circulares o pequeños golpes laterales durante 10 segundos. Incubar las tiras a 37 °C durante 20 minutos, cubriendo las tiras con cinta adhesiva nueva.
  8. Lavar 6 (seis) veces las tiras siguiendo el procedimiento descrito en el punto 6.
  9. Preparar la solución de sustrato/TMB siguiendo las indicaciones descritas en la preparación de reactivos. Dispensar 100 µl de la solución de sustrato/TMB en cada pocillo. Homogeneizar durante 10 segundos. Incubar las tiras a temperatura ambiente (20-25 °C) y en la oscuridad durante 10 minutos.
  10. Leer inmediatamente los resultados en forma visual, o alternativamente para lectura espectrofotométrica, frenar la reacción enzimática agregando 100 µl de ácido sulfúrico 1 mol/l a cada pocillo. Proceder a la lectura de las tiras en un lector vertical a 450 nm empleando blanco de aire antes de los 20 minutos.

## **Interpretación de los resultados**

### **a) Visual:**

El control negativo debe ser incoloro o celeste tenue. El control positivo debe presentar un color celeste claramente diferenciable respecto de los controles negativos.

Las muestras incoloras o con coloración similar a las de los controles negativos, se consideran no reactivas. Las muestras que presenten una coloración más intensa clara-mente diferenciables se consideran reactivas.

### **b) Espectrofotométrica:**

Proceder a la lectura de las tiras, siguiendo las instrucciones del lector.

Luego de la lectura espectrofotométrica de los resultados se procederá al cálculo del valor de Cut-off a partir de las densidades ópticas (OD) de los controles negativos.

$\text{Cut-off} = \text{OD promedio de los controles negativos} + 0,100$ .

Una muestra es considerada NO REACTIVA si su OD es inferior al valor del Cut-off.

Una muestra es considerada REACTIVA si su OD es igual o superior al valor del Cut-off.

## Validación de los resultados

Una prueba se considerará válida si:

La OD promedio de los controles negativos es menor a 0,250.

La OD del control positivo menos la OD promedio de los controles negativos es igual o mayor a 0,150.

Eliminar cualquier control negativo con OD mayor a 0,250.

Si se ha eliminado algún control negativo, volver a calcular el promedio de los controles negativos. Una corrida es válida si quedan más de la mitad de los controles negativos.

Si no se cumplen las condiciones de validación mencionadas deberá repetirse el test.

## Ejemplo del cálculo

Densidad óptica:

CN = 0,190; 0,200                      CNx = 0,195

CP = 0,450

Validación de los resultados:

$CN \leq 0,250$       Todos válidos

$CP - CNx \geq 0,150$  Válido

Cálculo del Cut-off:

$Cut-off = CNx + 0,100 = 0,195 + 0,100 = 0,295$

Cut-off = 0,295

## Sensibilidad y Especificidad

El CHAGATEX ELISA presenta una sensibilidad del 100% asumiendo una prevalencia del 100% en la presencia de anticuerpos IgG específicos detectables por otras técnicas como IFI, HAI y AD y una especificidad superior al 99%.

## Bibliografía

Ver página 19.

## Presentación

Equipo por 96 determinaciones. Número de Producto 399.

Equipo por 192 determinaciones. Número de Producto 380.

Elaborado por: LABORATORIO LEMOS S.R.L.

Director Técnico: Jorge O. Carradori, Bioquím. y Farm.

Santiago del Estero 1162 - C1075AAX Buenos Aires, Argentina

Telefax.: (5411) 4304-2204 / 2374

Producto para diagnóstico autorizado por el M.S. y A.S. Certificado N° 001385/96.

Disposición N° 676/01

Distribuido exclusivamente por: BIOMÉRIEUX ARGENTINA S.A.

Av. Congreso 1745 - C1428BUE Buenos Aires, Argentina

Tel.: (5411) 5555-6800    Fax: (5411) 5555-6888

## **Bibliografía / Referências e bibliografia / References**

1. Apt, W. & Reyes, H.: Algunos aspectos de la Enfermedad de Chagas en Latinoamérica. *Parasitol. al día* 14:23-40 (1990).
2. Camargo, M.E.; Ferreira, A.W.; Ores, B.A.; Mendonça Previato, I. and Scharfstein, J.: Trypanosoma cruzi antibodies. 368-382 (1986). In H. U. Bermeyer (ed.), *Methods of enzymatic analysis*, 3rd ed. Vol.11, V. Weinbeccin.
3. Camargo, M.E.; Segura, B.I.; Kagan, I.G.; Souza, I.M.P.; Cavalheira, J.R. and Guimarães, M.C.S.: Three years of collaboration on the standarization of Chagas disease serodiagnosis on the American Continent. An appraisal. *Pan. Am. Health Organ.* 20:233-244 (1986).
4. Camargo, M.E.: American Trypanosomiasis (Chagas Disease). 744-753 (1986). In Ballows, A.; Hausler, W.J. and Lennette, E.H. (ed) *Laboratory diagnosis of infection disease*. Vol. I, 3p. V. New York Inc., New York.
5. Cantero, L.; Butler, J. and Osborne, J.: The absorptive characteristics of proteins for polystyrene and their significance in solid phase immuno assays. *Analytical biochemistry* 105:375-382 (1980).
6. Koberle, F.: Pathogenesis of Chagas Disease in Trypanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chagas. *CIBA foundation news symposium N° 20*:137-158 (1974).
7. Brener, Z.: Biology of Trypanosoma cruzi. *Ann. Rev. Microbiol.* 26:347 (1973).
8. Hoff, R.; Todd, C.W.; Maguire, J.H.; Piesman, J.; Molt, E.; Sleigh, I.A.; Weller, T.H.: Serologic surveillance of Chagas Disease. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.* 65(1):187-196 (1965).
9. Ferreira, A.W.; Camargo, M.E. and Nakahara, O.S.: Trypanosoma cruzi immunoperoxidase antibody test for serologic diagnosis. *Exp. Parasit* 37:131-137 (1965).
10. Segura, E.L.; Perez, A.C.; Yanovsky, J.F.; Andrade, J. and Wynne de Martin, G.J.: Decrease in the prevalence of infection by Trypanosoma cruzi (Chagas Disease) in young men in Argentina. *PAHO Bulletin.* 19:253.264 (1965).