

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 IgG específicos contra el Trypanosoma cruzi en suero o plasma humano

Fundamento del método

CHAGATEK ELISA es un sistema de enzimoimmunoensayo (ELISA) basado en el método indirecto para la detección de anticuerpos IgG específicos contra el Trypanosoma cruzi (T. cruzi) en muestras de suero o plasma humano.

Luego de una dilución apropiada de las muestras, éstas se incuban en los pocillos de poliestireno, recubiertos con antígenos purificados de lisado de T.cruzi correspondiente a zonas altamente conservadas entre distintas cepas.

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 conjugada con peroxidasa. Este conjugado reacciona específicamente con los anticuerpos anti-T.cruzi inmunocapturados. 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 hidrogeno 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

<u>96 determinaciones</u>	<u>192 determinaciones</u>	
1 x 96	2 x 96	Microplacas Microplacas con tiras rompibles con pocillos sensibilizados con antígenos purificados de T.cruzi, envasadas en envase de polietileno metalizado con base de aluminio conteniendo silicagel como desecante.
1 Frasco (0,6 ml)	1 Frasco (0,8 ml)	Control Positivo* Suero reactivo para anticuerpos anti-T.cruzi, inactivado, estabilizado, de bajo título, con Azida de Sodio 0,2% P/V como conservador. Material potencialmente infeccioso. Listo para usar.
1 Frasco (0,6 ml)	1 Frasco (0,8 ml)	Control Negativo* Suero no reactivo para anticuerpos anti-T.cruzi, inactivado, estabilizado, con Azida de Sodio 0,2% P/V como conservador. Material potencialmente infeccioso. Listo para usar.
1 Frasco (50 ml)	1 Frasco (100 ml)	Buffer de Lavado Concentrado 25 X Tampón fosfato concentrado con surfactante. Diluir 1:25 con agua destilada para su uso.
1 Frasco (2,5 ml)	1 Frasco (3,5 ml)	Conjugado Concentrado 10 X Anticuerpo monoclonal anti-IG humana marcado con peroxidasa, estabilizado, con Proclin 150 0,2 % V/V como conservador. Diluir 1:10 para su uso con Diluyente de conjugado.
1 Frasco (9 ml)	1 Frasco (15 ml)	Solución Estabilizada de Peróxido de Hidrógeno tamponado. Listo para usar.

1 Frasco (9 ml)	1 Frasco (15 ml)	Solución Estabilizada de TMB 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (TMB). Listo para usar.
1 Frasco (25 ml)	1 Frasco (50ml)	
		Diluyente de Muestras Estabilizado. Solución salina proteica base PBS con Proclin 150 0,2 % V/V como conservador. Listo para usar. Agitar antes de usar.
1 Frasco (15 ml)	1 Frasco (30 ml)	Diluyente de Conjugado Estabilizado. Solución salina proteica base PBS, con Proclin 150 0,2 % V/V como conservador. Listo para usar. Agitar antes de usar.
1 Frasco (15 ml)	1 Frasco (30 ml)	Ácido Sulfúrico 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 contienen los pocillos, debe sacar los necesarios para los análisis de las muestras y los controles y volver a cerrar el sobre herméticamente con los 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 ó desionizada.
- Micropipetas de 10 µl., 100 µl y 200 µl.
- Tips descartables para micropipetas.
- Papel absorbente.
- Material volumétrico de vidrio para preparar diluciones.
- Termobloque incubador ó estufa ó baño de agua termostatzado a 37 ± 2 °C.
- Lavador o sistema equivalente para pocillos de ELISA. Como alternativa se puede efectuar el lavado manualmente.
- Lector fotométrico de ELISA lineal 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 consideradas 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 contaminación, no tocar con los dedos ni con los tips la parte superior, inferior o el borde de los pocillos.

Preparación de los Reactivos

1-*Microplacas*: Están listas para su uso y son estables hasta la fecha de caducidad indicada en el kit, 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 provisto (1:10). Homogeneizar suavemente. Preparar inmediatamente antes de su uso. La solución así preparada es estable cuatro Horas a temperatura ambiente.

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/TMB*: Minutos antes de usar mezclar un volumen de Peróxido de Hidrógeno con un volumen de TMB (1:1) en un recipiente de plástico descartable, en cantidad necesaria de acuerdo a las necesidades. La solución así preparada es estable por un máximo de una Hora a temperatura ambiente en la oscuridad.

Recolección y preparación de la Muestra

- Puede utilizarse suero o plasma preparado con los siguientes anticoagulantes: 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 entre 2 y 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. Extraer del envase los pocillos necesarios para la cantidad de determinaciones a realizar, mas dos controles negativos y un control positivo.
2. Agregar a cada pocillo 200 µl de diluyente de muestra.
3. Dispensar en los pocillos correspondientes 10 µl. de controles (2 Negativos y 1 positivo) y 10 µl. de cada muestra. Homogenizar 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 los pocillos con cinta adhesiva nueva (de uso alternativo). Sacar la cinta antes de lavar.
6. Lavar los pocillos siguiendo el procedimiento de lavado:
 - a) Aspirar el contenido de los pocillos y a continuación llenarlo 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 asegurarse su total escurrido.

7. Durante la incubación preparar el conjugado siguiendo las indicaciones descriptas en la preparación de reactivos. Luego del lavado, dispensar 100 µl. de la solución de conjugado a cada pocillo. Homogenizar aplicando movimientos circulares o pequeños golpes laterales durante 10 segundos. Incubar los pocillos a 37 °C durante 20 minutos, cubriéndolos alternativamente con cinta adhesiva nueva.
8. Lavar 6 (seis) veces los pocillos siguiendo el procedimiento descrito en el punto 6.
9. Preparar la solución de Peróxido de Hidrógeno/TMB siguiendo las indicaciones descriptas en la preparación de reactivos. Dispensar 100 µl. de la solución de Peróxido de Hidrógeno/TMB en cada pocillo. Homogenizar durante 10 segundos. Incubar los pocillos 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 los pocillos 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 muestra incoloras o con coloración similar a las de los controles negativos, se consideran no reactivas. Las muestras que presenten una coloración mas intensa claramente diferenciables, se consideran reactivas.

b) Espectrofotométrica:

Proceder a la lectura de los pocillos, 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:

$\text{Cut-off} = CNx + 0,100 = 0,195 + 0,100 = 0,295$

Cut-off= 0,295

Sensibilidad y Especificidad

El CHAGATEK 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

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.; Mendoça 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. Weinbeoin.
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.; Mott, E.; Sleigh, I.A.; Weller, T.H.: Serologic surveillance of Chagas Disease.
9. Ann. Soc. Belge Med. Trop, 65(1):187-196 (1965).
10. Ferreira, A.W.; Camargo, M.E. and Nakahara, O.S.: Trypanosoma cruzi immunoperoxidase antibody test for serologic diagnosis. Exp. Parasit 37:131-137 (1965).
11. 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).

Presentación

96 determinaciones.

192 determinaciones.

LABORATORIO LEMOS S.R.L.

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

Santiago del Estero 1162

C1075AAX. C.A.B.A. Argentina.

Telefax: (5411) 4304-2204/2374

E-mail: info@lab-lemos.com

www.lab-lemos.com

Autorizado por A.N.M.A.T. PM-1545-1385

USO PROFESIONAL-VENTA EXCLUSIVA
A LABORATORIOS DE ANÁLISIS CLÍNICOS.

Industria Argentina