

Immunoensayo de la Enzima para la Determinación de Anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* en Suero o plasma Humano

Solo para diagnóstico In Vitro

Para uso exclusivo de laboratorios clínicos o de gabinete

Conservar entre 2°C a 8°C

USO DESTINADO

Ensayo inmunoenzimático (MicroElisa) para la determinación de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* en muestras de suero o plasma humano. Solo para uso *In vitro*.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de "Chagas" es ocasionada por el parásito *Trypanosoma cruzi* y transmitida al ser humano por diversas especies de triatomas, siendo uno de los mayores problemas de salud pública en los países de Latinoamérica. En los bancos de sangre de estos países se examina la sangre para verificar la exposición previa al parásito y de esta manera descartar los donadores positivos.

Los ensayos de escrutinio serológico como las pruebas de ELISA han demostrado una gran sensibilidad y especificidad para la determinación de anticuerpos anti-*T. cruzi*.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

ACCUTRACK CHAGAS ELISA es un ensayo inmunoenzimático (ELISA) en microplacas, basado en el método indirecto para la determinación de anticuerpos anti-*T. cruzi* en muestras de suero o plasma humano. Después de la dilución indicada de las muestras, éstas se incuban en los pocillos de las tiras 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. Después del proceso de lavado para la eliminación de las inmunoglobulinas que no se unieron, se incuban con anticuerpos monoclonales anti-IgG humana conjugada con peroxidasa. Este conjugado reacciona de manera específica con los anticuerpos anti-*T. cruzi* inmunocapturados. Mediante el proceso de lavado se elimina el conjugado que no se unió y se revela la presencia de peroxidasa agregando una mezcla de peróxido de hidrógeno y tetrametilbencidina (TMB). Durante la incubación aparece 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 agregando ácido sulfúrico 1M, produciendo un cambio del color azul al amarillo. La presencia de un color leve o nulo, indica la ausencia de niveles detectables de anti-*T. cruzi* en la muestra.

REACTIVOS

Materiales abastecidos con el equipo de prueba

- **MICROPLACAS.** Conteniendo 12 tiras de 8 pocillos cada una, recubiertos con antígeno purificado de *T. cruzi*, envasadas en sobres recubiertos de polietileno metalizado con base de aluminio, conteniendo silica gel como desecante.
- **CONTROL NEGATIVO.** 1 Frasco. Suero no reactivo para anticuerpos anti-*T. cruzi*, inactivado, estabilizado. Material potencialmente

infeccioso. Listo para usar.

- **CONTROL POSITIVO.** 1 Frasco. Suero reactivo para anticuerpos anti-*T. cruzi*, inactivado, estabilizado, de bajo título. Listo para usar. Material potencialmente infeccioso.
- **BUFFER DE LAVADO CONCENTRADO 25x.** 1 Frasco. Tampón fosfatos concentrado. Diluir 1:25 con agua destilada para su uso.
- **CONJUGADO CONCENTRADO 10x.** 1 Frasco. Anticuerpo monoclonal anti-IgG humana marcada con peroxidasa, estabilizado. Diluir 1:10 para su uso con diluyente de conjugado.
- **SOLUCIÓN DE PEROXIDO DE HIDRÓGENO.** 1 Frasco. Lista para usarse.
- **CROMÓGENO: SOLUCIÓN DE TETRAMETILBENCIDINA (TMB).** 1 Frasco. Lista para usarse.
- **DILUYENTE DE MUESTRAS.** 1 Frasco. Solución salina proteica base PBS. Listo para usarse. Agitar antes de usar.
- **DILUYENTE DE CONJUGADO.** 1 Frasco. Solución proteica. Listo para usar. Agitar antes de usar.
- **ÁCIDO SULFÚRICO 1M.** 1 Frasco. Solución 1 mol/L de ácido sulfúrico en agua destilada. Listo para usar.

Nota: Los controles están preparados con suero o plasma humano no reactivo para anticuerpos contra HIV, HCV y HBsAg. De cualquier manera los productos de origen humano deben manejarse con precaución como si estos fueran infecciosos.

Materiales requeridos pero no abastecidos

1. Micropipetas de 10 µL, 100 µL y 200 µL
2. Agua destilada
3. Material volumétrico de vidrio para preparar diluciones
4. Incubador de 37 ± 2°C
5. Puntas desechables para micropipetas
6. Papel absorbente
7. Lavador de placas microelisa
8. Lector para placas microelisas con filtro de 450 nm.
9. Guantes desechables
10. Cronómetro
11. Solución de hipoclorito de sodio al 5% u otro desinfectante adecuado
12. Cinta adhesiva
13. Contenedor para residuos biológicamente peligrosos

ESTABILIDAD Y CONSERVACIÓN

Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la caja y en los frascos. Una vez abierto el sobre que contiene las tiras de reacción, deben únicamente sacarse las que se requieren para los análisis de las muestras y volver a cerrar herméticamente el sobre con las tirillas restantes, conservando el desecante en su interior. Deberá almacenarse a temperatura de refrigeración (de 2 a 8° C).

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS SOBRE SU USO

1. Las muestras de suero humano y los controles deben ser considerados como potencialmente infecciosos, por lo que se recomienda respetar las condiciones de bioseguridad para su manejo y procesamiento.



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

Distribuido por:

DIAGNÓSTICA INTERNACIONAL S.A. de C.V.
Rudyard Kipling 4886 Col. Jardines de la Patria
CP 45110 Zapopan, Jalisco, México
Lada sin costo: 01 800 440 0404 c/ 10 líneas
Tel: 01 (33) 3770 1940 c/ 10 líneas

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

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

- Microplacas.** Están listas para usarse y son estables hasta la fecha de caducidad indicada en el producto, siempre y cuando se conserven a temperatura de 2 y 8°C. en su envase original, totalmente cerrados y sin remover el desecante.
- Solución de lavado.** Diluir una parte del contenido del frasco de buffer de lavado concentrado 25x en 24 partes de agua destilada. Esta solución final preparada es estable 15 días conservada en temperatura de refrigeración (2 a 8°C).
- 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. Esta solución es estable 4 horas a temperatura ambiente
- Diluyente de muestras.** Listo para usar. Agitar antes de usar.
- Controles Negativos y Positivos:** Listos para usar.
- Diluyente de Conjugado.** Listo para usar. Agitar antes de usar.
- Peróxido de hidrógeno.** Listo para usar.
- TMB.** Listo para usar.
- Ácido Sulfúrico:** Listo para usar.

PREPARACIÓN DEL CONJUGADO

Tiras	Conjugado	Diluyente conjugado
1	100 µL	0.9 mL
2	200 µL	1.8 mL
3	300 µL	2.7 mL
4	400 µL	3.6 mL

PREPARACIÓN DEL SUSTRATO TMB

Tiras	Peróxido de hidrógeno	TMB
1	100 µL	0.5 mL
2	200 µL	1.0 mL
3	300 µL	1.5 mL
4	400 µL	2.0 mL

Nota: Esta solución es estable por un máximo de 1 hora a temperatura ambiente y en la oscuridad.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

- Puede utilizarse suero o plasma obtenido 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 hemólisis.
- Las muestras con azida de sodio u otro tipo de partículas pueden dar resultados erróneos.

- Las muestras con niveles elevados de bilirrubina, hemoglobina, lípidos o proteínas no afectan el resultado de la prueba.
- Las muestras no deben tener contaminación microbiana y pueden conservarse de 2 a 8° C durante una semana. Las muestras recién obtenidas pueden conservarse durante un año a menos -20° C.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

- Colocar los pocillos necesarios para la cantidad de pruebas a realizar, más dos controles negativos y un control positivo.
- Agregar a cada pocillo 200 µL de diluyente de muestra.
- Dispensar en los pocillos correspondientes 10 µL de controles (2 negativos y 1 positivo) y 10µL de cada muestra. Homogenizar mediante el uso de la micropipeta. Agitar con movimientos circulares durante 10 segundos.
- Incubar a 37 °C. durante 20 minutos.
- Cubrir las tiras con cinta adhesiva nueva. Quitar la cinta antes de lavar.
- Lavar las tiras siguiendo el procedimiento de lavado: **A) Aspirar el contenido de los pocillos y 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 lavados. B) Después de la última aspiración colocar los pocillos invertidos sobre papel absorbente, golpearlos suavemente para asegurar su total escurrido.**
- Durante la incubación preparar el conjugado siguiendo las indicaciones descritas en la preparación de reactivos. Después del lavado, dispensar 100 µL de la solución de conjugado a cada pocillo. Homogeneizar aplicando movimientos circulares durante 10 segundos. Incubar las tiras a 37°C. durante 20 minutos, cubriendo las tiras con cinta adhesiva nueva.
- Lavar seis veces las tiras siguiendo el procedimiento descrito en el punto 6.
- Preparar la solución de sustrato/TMB de acuerdo a las indicaciones anteriores. Dispensar 100 µL de la solución de sustrato/TMB en cada pocillo. Homogeneizar durante 10 segundos. Incubar las tiras a temperatura ambiente (20 a 25°C.) y en la oscuridad durante 20 minutos.
- Parar la reacción enzimática agregando 100 µL de ácido sulfúrico 1 mol/L a cada pocillo.
- Leer la absorbancia de las muestras y controles de las tiras en un lector con 450 nm, utilizando un blanco de aire antes de los 20 minutos.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

VISUAL: El control negativo debe ser incoloro o azul tenue. El control positivo debe presentar un color celeste 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 presentan una coloración más intensa se consideran reactivas.

ESPECTROFOTOMÉTRICA: Realizar la lectura de las tiras, siguiendo las instrucciones del lector de microplacas. Después de ésta lectura de los resultados, se procederá al cálculo del valor de corte (Cut-off) a partir de las densidades ópticas (DO) de los controles negativos.

Cut-off= DO promedio de los controles negativos+ 0.100

- Una muestra es considerada NO REACTIVA cuando su DO es menor al valor del Cut-off.
- Una muestra es considerada REACTIVA cuando su DO es igual o mayor al valor del Cut-off.

VALIDACIÓN DE RESULTADOS

Una prueba se considera válida cuando:

- La DO promedio de los controles negativos es menor a 0.250.

- La DO del control positivo menos la DO promedio de los controles negativos es igual o mayor a 0.150.
- Eliminar cualquier control negativo con DO mayor a 0.250.
- Cuando se elimina algún control negativo, volver a calcular el promedio de los controles negativos.
- Una corrida es válida cuando quedan más de la mitad de los controles negativos.
- Si no se cumplen las condiciones de validación mencionadas deberá repetirse el ensayo.

EJEMPLO DE CÁLCULO

Densidad óptica:

CN= 0.190; 0.200 CNx = 0.195
 CP= 0.450

Validación de los resultados:

CN 0.250 Todos válidos
 CP-CNx 0.150 Válido

Cálculo de Cut-off:

Cut-off= CNx + 0.100 = 0.195 + 0.100 = 0.295
 Cut-off= 0.295

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

ACCUTRACK CHAGAS ELISA presenta una sensibilidad del 100%, así como una especificidad mayor al 99%.

REFERENCIAS

1. Apt, W. & Reyes, H.: *Algunos Aspectos de la enfermedad de Chagas en Latinoamérica. Parasitol. Al día* 14:23-40 (1990).
2. Segura B.I. Kagan, I.G Souza I.M.P. Cavalherira, J.R. and Guimaraes, M.C.S. *Three years of collaboration on the standardization of chagas disease serodiagnosis on the American Continent. An Appraisal. Pan Am. Health Orga.* 20:233-244 (1986).
3. Camargo, M.E. *American Tripanosomiasis (Chagas disease) 744-753 (1986) In Ballow, A. ; Hausler, W.J. and Lennette, E.H. (ed) Laboratory diagnosis of infection disease. Vol. 1, 3p. V. New York inc. New York.*
4. Cantero, L. Butler, J. and Osborne, J.: *The abstruptive characteristics of proteins for polystyrene and their significance in solid phase immuno assays. Analytical biochemistry* 105: 375-382 (1990)
5. Ferreira, A.W. Camargo, M.E. and Nakahara, O.S. *Trypanosoma cruzi immunoperoxidase antibody test for serologic diagnosis. Exp. Parasit* 3737:131-137 (1965)
6. 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. PAHOBulletin, 19:253-264 (1965)*

Diagnóstica
 Internacional



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

FABRICADO POR:
 LABORATORIO LEMOS S.R.L.
 SANTIAGO DEL ESTERO 1162, BUENOS
 AIRES, ARGENTINA, C1075AAX