

Imuno-Elisa CHAGAS

Kit para determinação qualitativa e semi-quantitativa de anticorpos IgG anti-Trypanosoma cruzi no soro humano, por enzimmunoensaio (ELISA) usando antígeno recombinante.

An enzyme immunoassay (ELISA) kit for the qualitative and semi-quantitative detection of IgG antibodies anti-Trypanosoma cruzi in human serum using recombinant antigen.

Kit para la determinación cualitativa e semi-cuantitativa de anticuerpos IgG anti-Trypanosoma cruzi en el suero humano, por enzimmunoensaio (ELISA) usando antígeno recombinante.

REF 44096-E: 96 determinações / determinations / determinaciones

REF 44192-E: 192 determinações / determinations / determinaciones

WAMA Diagnóstica
Rua Aldo Germano Klein, 100 - CEAT
CEP 13560-971 - São Carlos - SP - Brasi
Fone 55 16 3377 9970 / Fax 55 16 3377 9970
www.wamadiagnostics.com.br

OBELIS SA
Avenue de Tervueren, 34 bte 44, 1040
Brussels - Belgium / www.obelis.net

PORTUGUÊS

IMPORTÂNCIA CLÍNICA

A doença de Chagas ou Tripanosomíase Americana é uma *infecção-endêmica*, de evolução essencialmente crônica, causada por um protozoário, o *Trypanosoma cruzi*, e transmitida ao homem por um inseto, o triatomíneo. Immunologicamente, 3 estágios podem ser considerados: agudo, latente ou indeterminado e crônico. Na fase aguda, verificam-se febre, miocardíopatia, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia e parasitemia. A multiplicação intracelular dos parasitas nos músculos lisos e estriados e células do sistema retículo endotelial acarretam a formação de pseudocistos. Na fase intermédia ou latente não há sintomas. A doença evolui para a fase crônica com sinais de miocardíopatia, degeneração das células ganglionares do sistema nervoso central e periférico, e hipertrofia e dilatação de certos órgãos, tais como esôfago e cólon, constituindo os mega.

Pelos altos índices de prevalência e morbidade ela se tornou um dos maiores problemas de saúde pública em toda a América Latina.

Como a maioria dos indivíduos com sorologia positiva para *T. cruzi* desenvolve evidências clínicas da doença crônica, as informações prestadas pelo laboratório clínico tornam-se decisivas no diagnóstico etiológico.

Após são os métodos utilizados para o diagnóstico da doença de Chagas: reação de fixação de complemento, aglutinação, precipitação, imunofluorescência, hemaglutinação e imunoenzimático.

Destes, os mais utilizados são as reações de hemaglutinação indireta (HAI) e as reações de imunofluorescência indireta (IFI).

Atualmente, os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) vem sendo cada vez mais utilizados pela facilidade de execução, ótima sensibilidade e especificidade, e possibilidade de automação.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

As cavidades da placa de microtitulação são cobertas com antígeno recombinante do *Trypanosoma cruzi* altamente purificado. Anticorpos específicos anti-Trypanosoma cruzi dos soros ligam-se a esses antígenos. O material não ligado é retirado por lavagem e uma antígenoaglutinina anti-IgG humana marcada com peroxidase é aplicada a reação. Este conjugado liga-se aos anticorpos específicos IgG humanos anti-*Trypanosoma cruzi* ligados ao antígeno da placa. O material não ligado é novamente retirado por lavagem e adicionado um substrato (TMB) que desenvolverá cor nas cavidades onde a enzima (peroxidase) estiver presente, indicando a presença de anticorpo humano anti-*Trypanosoma cruzi*. A reação enzimática é parada pela adição de uma solução stop e a absorbância é medida a 450 nm. A concentração de anticorpo IgG específico é diretamente proporcional à intensidade da cor da reação.

APRESENTAÇÃO DO KIT

REF 44096-E - 96 determinações

- Microplaca com cavidades cobertas com antígeno recombinante do *Trypanosoma cruzi* (12 x 8 cavidades)
- Solução diluente "laranja" (1 x 100ml)
- Tampão de lavagem - 20 X concentrado (1 x 50 ml)
- Conjugado anti-IgG humana marcado com peroxidase (11ml)
- Substrato cromogênico (TMB) (11ml)

- Solução stop (11ml)
- Soro controle negativo (2ml)
- Soro controle positivo baixo (2,5ml)
- Soro controle positivo alto (2ml)

10. Instruções para uso

REF 44192-E - 192 determinações

- Microplaca com cavidades cobertas com antígeno recombinante do *Trypanosoma cruzi* (24 x 8 cavidades)
- Solução diluente "laranja" (2 x 100ml)
- Tampão de lavagem - 20 X concentrado (2 x 50ml)
- Conjugado anti-IgG humana marcado com peroxidase (2 x 11ml)
- Substrato cromogênico (TMB) (2 x 11ml)
- Solução stop (2 x 11ml)
- Soro controle negativo (2 x 2ml)
- Soro controle positivo baixo (2 x 2,5ml)
- Soro controle positivo alto (2 x 2ml)
- Instruções para uso

MATERIAL NECESSÁRIO, MAS NÃO FORNECIDO

- Micropipetas
- Água destilada ou deionizada para diluição do tampão de lavagem.
- Incubador com temperatura de 37°C.
- Leitor de microplaca com filtro de 450 nm.
- Papel absorvente.
- Recipiente para descarte de material.

PREPARAÇÃO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

MICROPLACA (1): estável até a data do vencimento se conservada entre 2-8°C. Retirar do envelope a quantidade de tiras que serão usadas e deixá-las atingir a temperatura ambiente (20-25°C). Manter no envelope laminado com dessecante e entre 2-8°C as tiras que não forem utilizadas.

SOLUÇÃO DILUENTE (2): estável até a data do vencimento se conservada entre 2-8°C. Será utilizada para diluir as amostras de soro dos pacientes a 1/25. Após diluídas, as amostras devem ser usadas dentro de 8 horas. Não congelar. Contém *Proclin 300 a 0,05 % como conservante. Deixar atingir a temperatura ambiente (20-25°C) antes de usar.

TAMPÃO DE LAVAGEM (3): diluir o tampão de lavagem concentrado usando 1 parte do tampão com 19 partes de água destilada ou deionizada. Durante cada ciclo de lavagem, cada cavidade deve ser completada com aproximadamente 300µl. O tampão de lavagem diluído é estável por 4 semanas entre 2-8°C. Contém *Proclin 300 a 0,05% como conservante. Deixar atingir a temperatura ambiente (20-25°C) antes de usar.

CONJUGADO ANTI-IgG HUMANA MARCADO COM PEROXIDASE (4): pronto para uso. Estável na geladeira entre 2-8°C até a data do vencimento. Não congelar. Contém *Proclin 300 a 0,05% como conservante. Deixar atingir a temperatura ambiente (20-25°C) antes de usar.

SUBSTRATO CROMOGÊNICO (TMB) (5): pronto para uso. Estável na geladeira entre 2-8°C até a data de vencimento. Não congelar. Contém *Proclin 300 a 0,05% como conservante. Deixar atingir a temperatura ambiente (20-25°C) antes de usar. O TMB não é mutagênico e carcinogênico.

SOLUÇÃO STOP (6): pronto para uso. É ácido clorídrico (HCl) e, portanto, corrosivo. Manusear com cuidado. Em caso de contato com a pele lavar abundantemente em água corrente. Deixar atingir a temperatura ambiente (20-25°C) antes de usar. Estável até a data do vencimento.

SORO CONTROLE NEGATIVO (7): pronto para uso. Usar puro, ou seja, não diluído. Conservar em geladeira entre 2-8°C até a data do vencimento. Contém *Proclin 300 a 0,05% como conservante.

SORO CONTROLE POSITIVO BAIXO (8): pronto para uso. Usar puro, ou seja, não diluído. Conservar em geladeira entre 2-8°C até a data do vencimento. Contém *Proclin 300 a 0,05% como conservante. Deve ser usado em duplicata para checar a performance do teste e determinar o valor do cut-off.

SORO CONTROLE POSITIVO ALTO (9): pronto para uso. Conservar em geladeira entre 2-8°C até a data do vencimento. Contém *Proclin 300 a 0,05% como conservante.

* Proclin 300 é marca registrada pertencente a ROHM&HAAS Limited.

Obs.: O kit mantém o mesmo desempenho após a primeira utilização, e é estável até a data de validade descrita no rótulo, desde que mantido na temperatura indicada (2 - 8°C).

AMOSTRAS

Usar amostra de soro livre de hemólise, lipemia e contaminação. Amostra de plasma colhida com EDTA, heparina ou oxalato pode interferir com o procedimento do teste e deve ser evitada.

O soro pode ser conservado em geladeira entre 2-8°C por 48 horas. Para um tempo maior, deve ser guardado no freezer a -20°C por até 1 ano. Amostras congeladas devem ser homogeneizadas antes do teste. Evitar formação de espuma. Não usar azida sódica como conservante, pois esta pode inibir a enzima peroxidase.

Após diluir o soro com a solução diluente usar em 8 horas.

Evitar repetidos congelamentos e descongelamentos, pois isto causará falsos resultados.

DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras a serem testadas a 1:25;

Em tubo

20 l do soro + 480 l da solução diluente. Usar dentro de 8 horas. Dispensar 125 l das amostras diluídas a 1:25 nas cavidades da placa.

Na placa

5 l do soro + 120 l da solução diluente e proceder o teste conforme técnica descrita.

CONTROLE

Os controles devem ser incluídos para garantir precisa interpretação dos resultados. Os controles não são prontos para uso, e não devem ser diluídos, usar diretamente na placa conforme plano estabelecido de distribuição.

PROCEDIMENTO

1. De acordo com o plano estabelecido de distribuição na placa, usar 1 cavidade para o soro controle negativo (7), 1 cavidade para o soro controle positivo alto (9) e 2 cavidades para o soro controle positivo baixo (8), o qual determinará o ponto de corte (cut-off).

2. Dispensar 125 l dos controles e amostras diluídas 1:25 caso tenha utilizada técnica de diluição em tubo. 125 l de tampão de lavagem. Homogeneizar levemente, batendo com os dedos nas bordas da placa ou por vibração mecânica por 15 segundos.

3. Cobrir a placa com folha adesiva, coloca-la sobre papel absorvente úmido e incubar a 37°C por 60 minutos.

4. Descartar o conteúdo da placa dentro de um recipiente contendo solução desinfetante.

5. Lavar a placa 3 vezes com tampão de lavagem diluído (3) (vide Preparação e Estabilidade dos Reagentes). Encher e esvaziar seguidamente as cavidades com aproximadamente 300 µl de tampão de lavagem. Recomenda-se o uso de uma lavadora de microplaca manual ou automática.

6. Após a última lavagem, inverter a placa e batê-la sobre papel absorvente para remover

tudo o líquido residual.

7. Dispensar 100 l do conjugado (4) em cada cavidade da microplaca. Homogeneizar levemente, batendo com os dedos nas bordas da placa ou por agitação mecânica (agitador de placa) por 15 segundos.

8. Cobrir a placa com a folha adesiva, colocá-la sobre papel absorvente úmido e incubar a 37°C por 30 minutos.

9. Realizar as etapas 4, 5 e 6.

10. Dispensar 100 l de substrato cromogênico (5) em cada cavidade da microplaca. Homogeneizar levemente, batendo com os dedos nas bordas da placa ou por agitação mecânica (agitador de placa) por 15 segundos.

11. Incubar a placa a 37°C, sobre uma superfície seca, por 15 minutos, **protegida da luz**.
12. Bloquear a reação dispensando 100 l da solução stop (6) em cada cavidade da microplaca. Homogeneizar levemente, batendo com os dedos nas bordas da placa ou por agitação mecânica (agitador de placa) por 30 segundos, assegurando que a cor azul mude completamente para amarelo.
13. Ler IMEDIATAMENTE após o bloqueio da reação em um leitor de microplaca com filtro de 450nm.

IMPORTANTES:

- O procedimento de lavagem é crítico para o desempenho do teste. Lavagens insuficientes resultarão leituras pouco precisas ou absorbâncias falsamente elevadas.
- A realização dos testes em duplicata, embora não obrigatória, é recomendada.
- O tempo gasto para a pipetagem das amostras e controles não deve exceder 30 minutos.

RESUMO DO PROCEDIMENTO

- Diluir o soro 1:25 (20 l do soro + 480 l da solução diluente (2));
- Pipetar 125 l do soro diluído e dos controles em cada cavidade da placa;
- Homogeneizar por 15 segundos e Incubar a 37°C por 60 minutos;
- Descartar o conteúdo da placa e lavar 3 vezes com tampão de lavagem (3);
- Pipetar 100 l do conjugado (4) em cada cavidade da placa;
- Homogeneizar por 15 segundos e Incubar a 37°C por 30 minutos;
- Descartar o conteúdo da placa e lavar 3 vezes com tampão de lavagem (3);
- Pipetar 100 l do substrato cromogênico (5) em cada cavidade da placa;
- Homogeneizar por 15 segundos e Incubar no escuro a 37°C por 15 minutos;
- Pipetar 100 l da solução stop (6) em cada cavidade da placa;
- Homogeneizar por 30 segundos;
- Ler a densidade óptica em um leitor de microplaca com filtro de 450nm.

CÁLCULOS DOS RESULTADOS

Determinar para cada teste e soro controle a densidade óptica (DO).

Cut off = Média das DO do Soro Controle Positivo Baixo

1.5

Validação do Ensaio: A média da DO do Soro Controle Positivo Baixo deverá ser 3 vezes maior do que a DO do Soro Controle Negativo.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS.

RESULTADO REAGENTE: D.O. da amostra maior que o borderline (zona duvidosa).

RESULTADO DUVIDOSO (borderline): D.O. da amostra menor que a D.O. do soro controle positivo baixo, mas maior que o valor de Cut-off. Está é a chamada zona duvidosa.

RESULTADO NÃO REAGENTE: D.O. da amostra menor que o Cut-off.

DESEMPENHO DO TESTE

Foram realizados testes para determinar a sensibilidade e especificidade do Imuno Elisa Chagas da Wama Diagnóstica. Utilizamos 120 amostras solidamente positivas e não foram encontrados resultados falso negativo, conferindo ao Imuno Elisá da Wama Diagnóstica uma sensibilidade de 100%. No teste de especificidade, utilizamos 642 amostras verdadeiramente negativas e não foram encontradas resultados positivos, conferindo uma especificidade ao Imuno Elisa Chagas da Wama Diagnóstica de 100%.

LIMITAÇÕES DE USO

Para a correta interpretação dos resultados os dados clínicos do paciente devem sempre ser considerados. Recomenda-se também para uma maior segurança na interpretação dos resultados sorológicos para a doença de Chagas a utilização de mais de um método de análise. A WAMA produz o **ImunoCon** CHAGAS (Cod. 14601-, 14100-1, 14200-1) por imunofluorescência indireta e o **Imuno-HAI CHAGAS** (Cod. 34096-H, 34192-H, 34380-H) por hemaglutinação indireta.

PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS

- Os reagentes devem ser conservados entre 2 - 8°C.
- Adata de validade corresponde ao último dia do mês assinalado nos rótulos dos frascos e da caixa do kit.
- Deve ser evitado expor os reagentes a temperaturas elevadas, bem como diretamente ao sol.
- Não congelar qualquer reagente, pois isto causará deterioração irreversível.
- Os reagentes contêm Proclin 300 a 0,05% como conservante, o qual pode ser tóxico se ingerido. No caso de contato com a pele, lavar abundantemente em água corrente.
- O Imuno-ELISA CHAGAS da WAMA contém materiais de origem humana, os quais foram testados, com resultados negativos para anticorpos anti-HIV 1 e II e anti HCV antigênio de superfície da hepatite B (HBsAg). Porém, como nenhum método diagnóstico oferece completa segurança, a ausência destes e de outros agentes infecciosos recomenda-se tratar todos os reagentes como materiais potencialmente infecciosos, bem como ter o mesmo cuidado no descarte destes materiais.
- Não utilizar reagentes ou microplacas de lotes diferentes.
- Deixar os reagentes adquirir a temperatura ambiente (20 - 25°C) antes de iniciar os testes.
- Os reagentes devem ser homogeneizados levemente por inversão e tampados imediatamente após o uso.
- Não deixar as cavidades da microplaca secar durante o ensaio.
- Evitar repetidas pipetagem dos reagentes estoques, pois isso pode causar contaminação.
- As amostras a serem testadas e os controles devem ser utilizados ao mesmo tempo para manter as mesmas condições do teste.
- Não usar reagentes após a data de validade.
- Descartar o material conforme regulamentações locais.
- Utilizar as Boas Práticas de Laboratório (BPLs) na conservação, manuseio e descarte dos materiais.

ENGLISH

SUMMARY

Chagas disease or American Trypanosomiasis is an endemic and chronic disease. Its pathogenic agent is a flagellate protozoan called *Trypanosoma cruzi* which is transmitted to humans by a bug, triatominae.

3stages can be present: acute, latent or indetermined and chronic.

The acute phase can present manifestations that include fever, myocardiopathy,

lymphadenopathy, hepatosplenomegaly and parasitaemia.

Pseudocyst is formed after intracellular multiplication of parasite on muscles and on cells of endothelial reticulum system.

Latent and intermediary stages are asymptomatic. The disease can evolve for the chronic phase with manifestations of myocardiopathy, degeneration of ganglion cells of peripheral and central nervous system and hypertrophy and dilatation of some organs such as oesophagus and colon.

Chagas disease remains a major health problem in many Latin American countries because the high numbers of deaths.

As the minority of patients presenting positive sorology for *T. cruzi* develop clinical evidence for chronic disease, information provided by the laboratory has a decisive and fundamental role for etiologic diagnosis.

Chagas disease methods are: Complement fixation, agglutination, precipitation, immunofluorescence, hemagglutination and ELISA from which the most used are indirect hemagglutination (HAI), indirect immunofluorescence (IFI) and ELISA.

ELISA methodology is increasingly used due to its easy-to-use format, excellent sensitivity and specificity and the possibility of automation.

PRINCIPLE OF THE METHOD

The microtiter wells of the plate are covered with highly purified recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi*.

The specific antibodies Anti-*Trypanosoma cruzi* present in serum bind to these recombinant antigens. The unbound material is removed by washing and an antigammaglobulin anti-IgG human marked with peroxidase is added to the reaction. This conjugate binds to the specific antibodies anti-*Trypanosoma cruzi* IgG human binded on the antigen on the plate.

The unbound material is removed again by washing and a substrate (TMB) is added which will develop a color on the wells in the presence of enzyme (peroxidase), indicating the presence of human antibody anti-*Trypanosoma cruzi*. The enzymatic reaction is stopped by the addition of a stop solution and the absorbance is measured at 450 nm. The concentration of specific IgG antibody is directly proportional to the intensity of the color of the reaction.

KIT PRESENTATION

REF 44096-E (96 determinations)

- Microplate with antigen of *Trypanosoma cruzi* (12x8 wells).
- Diluent solution "orange" (1 x 100ml)
- Wash buffer - 20 x concentrated (1 x 50 ml)
- Conjugate anti-human IgG Peroxidase (11ml)
- Cromogen (TMB) (11ml)
- Stop solution (11ml)
- Negative serum control (2ml)
- Positive serum control low (2,5ml)
- Positive serum control high (2ml)

10. Instructions for use

REF 44192-E (192 determinations)

- Microplate with antigen of *Trypanosoma cruzi* (12x8 wells).
- Diluent solution "orange" (2 x 100ml)
- Wash buffer - 20 x concentrated (2 x 50ml)
- Conjugate anti-human IgG Peroxidase (2 x 11ml)
- Cromogen (TMB) (2 x 11ml)
- Stop solution (2 x 11ml)
- Negative serum control (2 x 2ml)
- Positive serum control low (2 x 2,5ml)
- Positive serum control high (2 x 2ml)

10. Instructions for use

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Micropipettes
- Distilled or deionised water
- Incubator at 37°C.
- ELISA plate reader with 450nm filter
- Paper towel.
- Immunological container.

STABILITY AND STORAGE

MICROPLATE (1): Stable if stored at 2-8°C up to the expiration date. Remove from the envelope the number of strips needed and let them reach to room temperature (20-25°C). Keep the remaining strips in the aluminium pouch with desecant at 2-8°C.

DILUENT SOLUTION (2): Stable if stored at 2-8°C up to the expiration date. This solution is should be tested within 8 hours. Do not freeze. It contains *Proclin 300-0.05% as preservative. Allow the components to reach room temperature (20-25°) prior to use.

WASH BUFFER (3): Dilute wash buffer using 1 part of the buffer with 19 parts of distilled or deionised water. During each washing cycle, each well should be filled with 300µl. Wash buffer is diluted and stable for 4 weeks at 2-8°C. It contains *Proclin 300-0.05% as preservative. Allow the components to reach room temperature (20-25°) prior to use.

CONJUGATE ANTI-HUMAN IgG PEROXIDASE (4): Ready for use. Stable if stored at 2-8°C up to the expiration date. Do not freeze. It contains *Proclin 300-0.05% as preservative. Allow the components to reach room temperature (20-25°) prior to use.

CROMOGEN (TMB) (5): Ready for use. Stable if stored at 2-8°C up to expiration date. Do not freeze. It contains *Proclin 300-0.05% as preservative. Allow the components to reach room temperature (20-25°) prior to use. TMB is not mutagenic and carcinogenic.

STOP SOLUTION (6): Ready for use. This solution is hydrochloric acid (Hcl), therefore, it is corrosive to check carefully. Wash with abundant water. Allow the components to reach room temperature (20-25°) prior to use. Stable up to the expiration date.

NEGATIVE SERUM CONTROL (7): Ready for use. Do not dilute. Store at 2-8°C up to expiration date. It contains *Proclin 300 - 0.05% as preservative.

POSITIVE SERUM CONTROL LOW (8): Ready for use. Do not dilute. Store at 2-8°C up to the expiration date. It contains *Proclin 300 - 0,05% as preservative. It must be used in duplicate to check the best performance and cut-off value.

POSITIVE SERUM CONTROL HIGH (9): Ready for use. Store at 2-8°C up to the expiration date. It contains *Proclin 300 - 0.05% as preservative.

* Proclin 300 is ROHM&HAAS Limited registered trademark.

The kit presents good performance after being used for the first time. It is stable up to the expiration date if store at 2 - 8°C.

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Serum specimens free of haemolysis, lipemia and contamination should be used. Plasma specimens with EDTA, heparin or oxalate can interfere on the results and should be avoided.

Serum can be stored at 2-8°C for 48 hours. For longer storage, keep at -20°C up to 1 year.

Frozen samples must be homogenised prior to test. Avoid air bubbles. Do not use Sodium azide as preservative since the enzyme peroxidase can be inhibited.

After diluting the serum with diluent solution, use it within 8 hours. Avoid repeated freezing and thawing cycles.

DILUTION OF SPECIMEN

Dilute the serum to 1:25.

Tube

20µl of serum + 480µl of diluent solution. Best within 8 hours. Dispense 125µl of diluted specimens into the plate wells.

Plate

5µl of serum + 120µl of diluent solution and proceed the test as per described.

CONTROL

Controls should be included to guarantee precise interpretation of the results. The controls are ready for use. Do not dilute. Dispense them into the plate wells as per distribution plan.

PROCEDURE

1. According to the established distribution plan, use 1 well for negative serum (7), 1 well for positive control high(9) and 2 wells for positive control low(8), which will determine the cut-off value.

2. Dispense 125µl of controls and diluted specimens at 1:25 in case of dilution in tube. With the fingers, beat on the plate edges or by mechanical vibration for 15 seconds for an homogeneous mixture.

3. Cover the plate with an adhesive sheet, place the plate on a humid paper towel and incubate at 37°C for 60 minutes.

4. Discard the material in a container with disinfectant solution.

5. Wash three times the plate with diluted wash buffer (3) (see Stability and Storage steps). Fill and empty the well with 300µl of wash buffer. A manual or automatic microplate washer is recommended.

6. After the last washing, invert the plate and beat it against an absorbent paper to remove residual liquids.

7. Dispense 100µl of conjugate (4) into each well. With fingers, beat on the plate edges or by mechanical vibration (plate agitator) for 15 seconds for an homogeneous mixture.

8. Cover the plate with an adhesive sheet, place the plate on a humid absorbent paper and incubate at 37°C for 30 minutes.

9. Repeat the steps 4, 5 and 6.

10. Dispense 100µl of cromogen (5) onto each well. With fingers, beat on the plate edges or by mechanical vibration (plate agitator) for 15 seconds for an homogeneous mixture.

11. Incubate the plate at 37°C on a dry surface for 15 minutes. Protect from light.

12. Block the reaction by dispensing 100µl of stop solution (6) into each well. With the fingers, beat on the well edges or by mechanical agitation (plate agitator) for 30 seconds for an homogeneous mixture assuring that the blue color change to yellow.

13. After blocking of reaction, read IMMEDIATELY using a microplate reader with 450nm filter.

WASHING:

• Washing step is essential for the test performance. Insufficient washings will result in imprecised readings or absorbances falsely high.

• It is recommended to duplicate the tests.

• Do not take more than 30 minutes to dispense the specimens and controls.

SUMMARY OF PROCEDURE

1. Dilute the serum 1:25 (20µl of serum + 480µl of diluent solution (2));

2. Dispense 125µl of diluted serum and controls into each well;

3. Mix for 15 minutes and incubate at 37°C for 60 minutes;

4. Discard the plate content and wash 3 times with wash buffer (3);

5. Dispense 100µl of conjugate (4) into each well;

6. Mix for 15 seconds and incubate at 37°C for 30 minutes;

7. Discard the plate content and wash for 3 times with wash buffer (3);

8. Dispense 100µl of cromogen (5) into each well.

9. Mix for 15 seconds and incubate at 37°C for 15 minutes in a dark room.

10. Dispense 100µl of stop solution (6) into each well.

11. Mix for 30 seconds;

12. Read OD using a microplate reader with 450nm filter.

RESULTS

Determine OD for each test and serum control.

Cut off = OD Mean of positive serum control low

Validation of Test: OD Mean of positive serum control low should be 3 times higher than the OD of Negative Serum control.

INTERPRETATION

POSITIVE : OD of specimen is higher than borderline (dubious zone).

DUBIOUS RESULT (Borderline): OD of specimen is lower than O.D. of positive control serum low, but is higher than Cut-off value. It is called the dubious zone.

NEGATIVE : OD of specimen is lower than Cut-off value.

TEST PERFORMANCE

It was made tests to determine the sensitivity and specificity of Imuno-ELISA CHAGAS from WAMA Diagnostica. 120 known positive specimens were used and any false negative result was found. It awarded to Imuno-ELISA CHAGAS from WAMA Diagnostica a sensitivity of 100% on the specificity of the test. It was used 642 known negative specimens and any positive result was found what gave a specificity of 100% to Imuno-ELISA from WAMA Diagnostica.

LIMITATION OF USE

For a correct interpretation, patient's clinical data should be taken in account.

It is recommended the use of other methodology for the Chagas interpretation results. WAMA manufactures ImunoCon CHAGAS (Code. 1460-I, 14100-I, 14200-I) indirect immunofluorescence method and Imuno-HAI CHAGAS (Code. 34096-H, 34192-H, 34380-H) indirect hemagglutination method.

PRECAUTIONS AND WARNINGS

1. Reagents should be stored at 2-8°C

2. The expiration date is the last day of the month printed on the labels and on the kit box.

3. Avoid high temperatures and sunlight exposition.

4. Do not freeze the reagents. Irreversible damage.

5. Reagents contain Proclin 300 (0.05%) as preservative. Toxic if ingested. In case of skin contact, wash with plenty quantities of water.

6. The source material of Imuno-ELISA CHAGAS from WAMA used in the preparation of the controls

has been tested and confirmed negative for HCV, HIV and HBsAg. Because no test can offer complete assurance that products derived from human source will not transmit infectious agents it is recommended that these controls be treated as potential biohazards materials.

7. Do not interchange reagents or microplates from different lots.

8. Allow the reagents to reach room temperature (20-25°C) prior to use.

9. Reagents should be homogenized by inversion and sealed immediately after use.

10. Avoid the drying of wells during the test.

11. Avoid contamination by repeatedly pipetting the reagents.

12. Samples and controls should be tested and used at the same time to maintain test conditions.

13. Do not use components after the expiration date.

14. Dispose in accordance with the local regulations.

15. Follow good manufacturing practices (GMP) at storing, handling and material disposable.

ESPAÑOL

IMPORTANCIA CLÍNICA

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es una infección endémica de evolución esencialmente crónica, causada por un protozoario, o Trypanosoma cruzi, y transmitida por un insecto, el triatominé.

Imunológicamente, 3 etapas pueden ser considerados: agudo, latente o indeterminado y crónico. En la fase aguda, verificase fiebre, miocardiopatía, linfadenopatía, hepatosplenomegalia e parasitemia. La multiplicación intracelular de los parásitos en los músculos lisos y estriados y células del sistema retículo endotelial acarrea la formación de pseudocyst. En la fase intermedia o latente no hay síntomas. La enfermedad puede evolucionar para la fase crónica con señales de miocardiopatía, degeneración de las células ganglionares del sistema nervoso central y periférico, y hipertrofia y dilatación de ciertos órganos como el estomago, colon, constituyendo los mega.

Por los altos índices de prevalencia y morbilidad de ellas se torno un de los mayores problemas de salud pública en toda América latina.

Como en la mayoría de los individuos con serología positiva para T.cruzi desarrolla el cuadro clínico de la enfermedad crónica, las informaciones prestadas por el laboratorio clínico tornan se decisivas en el diagnóstico etiológico.

Varios son los métodos utilizados para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas: reacción de fijación de complemento, aglutinación, precipitación, inmunofluorescencia, hemaglutinación y inmunoenzimación

De esos, los más utilizados son las reacciones de hemaglutinación indirecta (HAI) y las reacciones de inmunofluorescencia indirecta (IFI).

10. Dispense 100µl of cromogen (5) onto each well. With fingers, beat on the plate edges or by mechanical vibration (plate agitator) for 15 seconds for an homogeneous mixture.

11. Incubate the plate at 37°C on a dry surface for 15 minutes. Protect from light.

12. Block the reaction by dispensing 100µl of stop solution (6) into each well. With the fingers, beat on the well edges or by mechanical agitation (plate agitator) for 30 seconds for an homogeneous mixture assuring that the blue color change to yellow.

13. After blocking of reaction, read IMMEDIATELY using a microplate reader with 450nm filter.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

Las cavidades de la placa de micro titulación son cubiertas con antígenos recombinante del Trypanosoma cruzi altamente purificado. Anticuerpos específicos anti-Trypanosoma cruzi presentes en el suero ligan se a esos antígenos. El material no ligado es retirado por aclaración es una antiaglutinabolina anti-IgG humana marcada con peroxidase, aplicada a la reacción. Este conjugado ligase a los anticuerpos específicos IgG humanos anti-Trypanosoma cruzi ligados al antígeno de la placa. El material no ligado es nuevamente retirado por lavaje y adicionado un substrato (TMB) que desenvolverá el color en las cavidades donde la enzima (peroxidase) estuviere presente, indicando la presencia del anti-Trypanosoma cruzi. La reacción enzimático es parada por la adición de una solución stop y la absorbancia es medida a 450nm. La concentración de anticuerpo IgG específico es directamente proporcional a la intensidad del color de la reacción.

PRESENTACIÓN DEL KIT

REF 44096-E-96 determinaciones

1. Micro placa con cavidades cubiertas con antígeno recombinante del Trypanosoma cruzi (12x8 cavidades)

2. Solución diluyente "naranja" (1x100ml)

3. Tapón de lavaje -20x concentrado (1x50ml)

4. Conjugado anti-IgG humana marcado con peroxidase (11ml)

5. Substrato cromogenito (TMB) (11ml)

6. Solución stop (11ml)

7. Suero control negativo (2ml)

8. Suero control positivo bajo (2,5ml)

9. Suero control positivo alto (2ml)

10. Instrucciones para uso

REF 44192-E - 192 determinaciones

1. Micro placa con cavidades cubiertas con antígeno recombinante del Trypanosoma cruzi (24x8 cavidades)

2. Solución diluyente "naranja"(2x100ml)

3. Tapón de lavaje -20x concentrado (2x50ml)

4. Conjugado anti-IgG humana marcado con peroxidase (2x11ml)

5. Substrato cromogenito (TMB) (2x11ml)

6. Solución stop (2x11ml)

7. Suero control negativo (2x2ml)

8. Suero control positivo bajo (2x2,5ml)

9. Suero control positivo alto (2x2ml)

10. Instrucciones para uso

MATERIAL NECESARIO, PERO NO FORNECIDO

- Micro pipetas

- Agua destilada o deionizada para dilución del tapón de aclaración

- Incubador con temperatura de 37°C.

- Lector de micro placa con filtro de 450 nm.

- Papel absorbente

- Recipiente para el descarte del material

PREPARACIÓN E ESTABILIDAD DOS REACTIVOS

- **Micro placa (1):** estable hasta la fecha de caducidad ser conservada entre 2-8°C. Retirar del sobre a la cantidad de tiras que serán usadas y déjelas atingir la temperatura ambiente (20-25°C). Mantener el sobre laminado con desecante y entre 2-8°C las tiras que no fueren utilizadas.

- **Solución Diluyente (2):** estable hasta la fecha de caducidad se conservada entre 2-8°C. Será utilizada para diluir las muestras de suero de los pacientes a 1/25. Después diluidas, las muestras deben ser usadas dentro de 8 horas. No congelar. Contiene Proclin 300 a 0,05% como conservante. Dejar atingir a temperatura ambiente (20-25°C) antes de usar.

- **Tapón de lavaje (3):** diluir el tapón de lavaje concentrado usando 1 parte do tapón con 19 partes de agua destilada o deionizada. Durante cada ciclo de aclaración, cada cavidad debe ser completada con aproximadamente 300ul. El tapón de lavaje diluido este estable por 4 semanas entre 2-8°C. Contiene Proclin 300 a 0,05% como conservante. Dejar atingir la temperatura ambiente (20-25°C) antes de usar.

- **Conjugado anti IgG humana marcado con peroxidase (4):** Listo para el uso. Estable en nevera entre 1-8°C hasta la fecha de caducidad. No congelar. Contiene Proclin 300 a 0,05% como conservante. Dejar atingir la temperatura ambiente antes de usar.

- **Substrato Cromogenito (TMB)(5):** listo para el uso. Estable en nevera entre 2-8°C hasta la fecha de caducidad. No congelar. Contiene Proclin 300 a 0,05% como conservante. Dejar atingir la temperatura ambiente antes de usar. El ITM no mutagénico y carcinogénico.

- **Solución Stop(6):** Listo para usar. Es ácido clorhídrico (CHl) y por lo tanto corrosivo. Manosear con cuidado. En el caso de contacto con la piel aclarar abundantemente en agua corriente. Dejar atingir la temperatura ambiente (20 25°C) antes de usar. Estable hasta la fecha de caducidad.

- **Suero Control Negativo (7):** listo para el uso Usar puro, es decir, no diluido Conservar en nevera entre 2-8°C hasta la fecha de caducidad Proclin 300 a 0,05% como conservante.

- **Suero Control positivo Bajo (8):** Listo para el uso Usar puro, es decir, no diluido Conservar en nevera entre 2-8°C hasta la fecha de caducidad Proclin 300 a 0,05% como conservante. Debe ser usado en duplicata para chequear la actuación del teste y determinar el valor del Cut-off.

Obs.: El kit mantiene el mismo desempeño después del primer uso, y es estable hasta la fecha de caducidad desde que sea mantenido en la temperatura de 2 -8°C.

MUESTRAS

Usar muestra de suero libre de hemolise lipemia y contaminación. Muestra de Plasma cogida con EDTA heparina o oxalato puede interferir como procedimiento del teste debe ser evitada

El suero puede ser conservado en nevera entre 2-8°C por 48 horas Para muestras congeladas deben homogenizadas antes del teste Evitar formación de espuma No usar azida sódica como conservante pues esta puede inhibir la enzima perstasise.

Dilución de la muestra

Diluir los sueros que serán testados a 1:25.

En Tubo

20 UI del suero 480UI de la solución diluyente Usar dentro de 8 horas Dispensar 125UI de las muestras diluidas a 1:25 en las cavidades de la placa.

En Placa

5UI de la muestras 120UI de la solución diluyente y proceder el teste conforme técnica descrita.

Control

Los controles deben ser incluidos para garantir precisa interpretación de los resultados Los controles están listos para el uso y no deben ser diluidos usar directamente la placa conforme plano establecido de distribución.

PROCEDIMIENTO

1. De acuerdo con el plano establecido de distribución de la placa usar 1 cavidad de suero control negativo (7) 1 cavidad de suero control positivo alto (9) y 2 cavidad para suero control positivo bajo (8) el cual determinara el punto de corte (Cut-off)

2. Dispensar 125 UI de los controles y muestras diluidas 1:25 caso hayan utilizado la técnica de dilución en el tubo. Homogenizar levemente golpeando con lo dedos en las bordas de la placa o por agitación mecánica (agitador de placa) por 15 segundos.

3. Cubrir la placa con el hoja adhesiva colócala sobre papel absorbente

4. Desinfectar el contenido de la placa dentro de un recipiente conteniendo solución desinfectante.

5. Lavar la placa 3 veces con el tapón de lavaje diluido (3) (ver: preparación y estabilidad de reactivos). Llenar y vaciar seguidamente la cavidades con aproximadamente 300 UI de tapón de lavaje. Recomendase el uso de una lavadora de micro placa manual o automática.

6. Después de la ultima aclaración invertir la placa y golpearla sobre el papel absorbente para remover todo el líquido residual.

7. Dispensar 100UI del conjugado (4) en cada cavidad de la micro placa Homogenizar levemente golpeando con lo dedos en las bordas de la placa o por agitación mecánica (agitador de placa) por 15 segundos.

8. Cubrir la placa con una hoja adhesiva colócala sobre el papel absorbente húmedo y encubar a 37°C por 30 minutos

9. repetir las etapas 4 y 5

10. Dispensar 100UI de substrato cromogenito (5) en cada cavidad de la micro placa Homogenizar levemente golpeando con lo dedos en las bordas de la placa o por agitación mecánica (agitador de placa) por 30 segundos asegurándose que el color azul no cambie completamente para el amarillo. Protegida de la luz

11. Incubar la placa a 37°C sobre una superficie seca por 15 minutos protegiendo de la luz.

12. Bloquear la reacción dispensando 100UI de la solución stop (6) en cada cavidad de micro placa Homogenizar levemente golpeando con lo dedos en las bordas de la placa o por agitación mecánica (agitador de placa) por 30 segundos asegurándose que el color azul no cambie completamente para el amarillo.

13. Leer inmediatamente después del bloqueo de reacción de un lector de micro placa con filtro 450 nm.

Importante

El procedimiento de aclaración es critico para el desempeño del teste. Aclaraciones insuficientes resultaran en lecturas poco precisas o absorbancia falsamente elevadas

La realización del teste en duplicata aun que no obligatoria es recomendada.

El tiempo gasto en pipetagen de las muestras y controles no deben exceder 30 minutos

RESUMO DEL PROCEDIMIENTO

1. Diluir el suero 1:25 (20 UI de la solución diluyente)(2)

2. Pipetar 125 UI del suero diluido y de los controles en cada cavidad de la placa

3. Homogenizar por 15 segundos a incubar a 37°C por 60 segundos

4. Detectar el contenido de la placa y lavar 3 veces el tapón de lavaje(3)

5. Pipetar 100UI del conjugado (4) en cada cavidad de la placa

6. Homogenizar por 15 segundos y encubar a 37°C por 30 minutos

7. Descartar el contenido de la placa y lavar 3 veces con el tapón de lavaje (3)

8. Pipetar 100 UI del substrato cromogenito (5) en cada cavidad de la placa

9. Homogenizar por 15 segundos y incubar en el oscuro a 37°C por 15 minutos

10. Pipetar 100 UI de la solución stop (6) en cada cavidad de la placa

11. homogenizar por 30 segundos

12. Leer la densidad óptica en lector de micro placa en filtros 450 nm.

Calculo de Resultados

Determinar para cada teste el suero control de la densidad óptica (DO)

Cut off = Medias de las DO del suero control positivo bajo

1,5

Validación del Ensayo

La medida del DO del suero control Positivo bajo deberá ser 3 veces mayor de que el DO del suero control negativo.

Resultado Reactivo

DO. De la muestra mayor que el de borderline (esta es llamada de zona dudosa)

Resultado Dudoso

DO. De la muestra menor que el DO del suero control positivo bajo pero mayor de que el valor del Cut off Esta es llamada de zona dudosa

Resultado no Reactivo

DO. De la muestra menor que el de Cut off

DESEMPEÑO DEL TESTE

Fueron realizados testes para determinar la sensibilidad y especificidad del Imnuo ELISA Chagas de la WAMA Diagnostica . Utilizamos 120 muestras solidamente positivas y no fueron encontrados resultado falso positivos confirmando al Imnuo ELISA de la WAMA una sensibilidad de 100 % . En el teste de especificidad utilizamos 642 muestras verdaderamente positivas confirmando a Imnuo ELISA Chagas de la

WAMA Diagnostica de 100%

LIMITACIONES DEL USO

Para la correcta interpretación de los resultados los datos clínicos del paciente deben ser siempre considerados. Recomendase también para una mayor seguridad en la interpretación de los resultados serológicos para la enfermedad de Chagas y la utilización de mas de un método de análisis. La WAMA produce el IMUNO-CON CHAGAS (cód.: 1460-I) por inmunofluorescencia indirecta y el IMUNO-HAI CHAGAS (cód. 34200-He 34400-H) por hemaglutinación indirecta.

PRECAUCIONES YADVERTENCIAS

1. Los reactivos deben ser conservados entre 2-8°C

2. La fecha de caducidad corresponde al ultimo día del mes enseñado en los rótulos de los frascos y de las cajas del kit

3. Debe ser evitado exponer los reactivos la temperatura elevadas tal como directamente al sol

4. No congelar cualquier reactivo pues esto causara su daño

5. Los reactivos contiene Proclin 300 a 0,05% con conservante el cual puede ser toxico si ingerido En el caso de contacto con la piel aclarar abundantemente en agua corriente

6. El Imnuo ELISA de la WAMA contiene materiales de origen humana los cuales fueron testados con resultados negativos para anticuerpos anti VIH 1 y II y anti HCV antigeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) Pnes con ninguno método diagnostico ofrece completa seguridad de la ausencia de este y de otros agentes infecciosos tal como tener el mismo cuidado con el descarte de estos materiales.

7. No utilizar los reactivos o micro placas de lotes distintos

8. Dejar los reactivos adquieren la temperatura ambiente (20 e 25°C) antes de iniciar el teste

9. Los reactivos deben ser homogenizados levemente por inversión y tapado inmediatamente después del uso.

10. No dejar las cavidades de la micro placa secar durante el ensayo

11. Evitar repetidas pipetagen de los reactivos estochos pues eso puede causar contaminación

12. Las muestras a ser testadas y los controles deben ser utilizados al mismo tiempo para mantener las mismas condiciones del teste.

13. No usar los reactivos del Kit después la fecha de caducidad.

14. Descarte de lo material de acuerdo con las regulaciones locals.

15. Utilizar las Buenas Practicas de Laboratorio (BPL) en la conservación, manoseo y descarte de los materiales.

BIBLIOGRAFIA

1. Büllow, L. and Lindblad, C.: Recombinant techniques in the preparation of protein conjugates. In: **Bioconjugation**. Macmillan reference, 1998.

2. Carbonetto, C. H. et al.: Estudios serológicos en pacientes con enfermedad de Chagas crónica. **Medicina** (Buenos Aires) 43: 131-136, 1983.

3. Crowther, J. R.: ELISA: Theory and Practice. **Humana Press**, 1995.