

# Manual de Instrucciones

## BIOZIMA CHAGAS

### ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA EL TRYPANOSOMA CRUZI EN SUERO HUMANO

Uso "In Vitro"

#### PRESENTACIONES

Equipo por 96 determinaciones (Cod.BCH96)  
Equipo por 192 determinaciones (Cod.BCH192)

#### APLICACION

BIOZIMA CHAGAS puede ser utilizado como auxiliar en el diagnóstico de casos presuntivos de Enfermedad de Chagas, para ensayos epidemiológicos o tamiz serológico.

#### FUNDAMENTO DEL METODO

Es un ensayo inmunoenzimático heterogéneo, no competitivo, basado en el método indirecto para la detección de anticuerpos contra el T.cruzi en muestras de suero ó plasma humano.

Una dilución apropiada de las muestras se incuban en pocillos de poliestireno, recubiertos con antígenos purificados de T.cruzi. Los anticuerpos contra T.cruzi son específicamente capturados por esos antígenos, quedando unidos a la fase sólida. Luego de varios lavados, a fin de eliminar las inmunoglobulinas no capturadas, el sistema se incuban con anticuerpos monoclonales anti-IgG humana conjugados a peroxidasa. Este conjugado reacciona específicamente con los anticuerpos contra T.cruzi inmunocapturados. El conjugado no unido se desecha por lavado y se revela la presencia de peroxidasa mediante el agregado de peróxido de hidrógeno/tetrametilbencidina como sustrato cromogénico. Esta incubación da como resultado la aparición de un color azul cuya intensidad depende de la concentración y de la afinidad de los anticuerpos contra T.cruzi de la muestra. La reacción enzimática se detiene mediante el agregado de ácido sulfúrico, lo que produce un viraje de color hacia el amarillo espectrofotométricamente cuantificable.

#### REACTIVOS Y MATERIALES PROVISTOS

- \* **Pocillos de reacción:** Pocillos de poliestireno en tiras rompibles, cada uno sensibilizados con antígenos purificados de T.cruzi, acondicionados en soportes envasados en presencia de silicagel como desecante. Cod.BCH96: 96 pocillos Cod.BCH192: 192 pocillos
- \* **Control Positivo (+):** Un frasco conteniendo una dilución de suero reactivo para anticuerpos contra T.cruzi, inactivado, de bajo título, con estabilizadores proteicos, con Azida de Sodio 0,2% P/V como conservador. Material potencialmente infeccioso. Listo para usar.  
Cod.BCH96: 0,6 ml Cod.BCH192: 0,8 ml
- \* **Control Negativo (-):** Un frasco conteniendo una dilución de suero no reactivo para anticuerpos contra T.cruzi, inactivado, con estabilizadores proteicos, con Azida de Sodio 0,2% P/V como conservador. Material potencialmente infeccioso. Listo para usar.  
Cod.BCH96: 0,6 ml Cod.BCH192: 0,8 ml
- \* **Solución para lavado 25X (1):** Un frasco conteniendo solución amortiguadora, con agentes surfactantes, concentrada 25 veces. Cod.BCH96: 50 ml Cod.BCH192: 100 ml
- \* **Diluyente de Muestras (2):** Un frasco conteniendo solución salina proteica con Proclin 150 0,2 % V/V como conservador. Agitar antes de usar. Cod.BCH96: 25 ml Cod.BCH192: 50 ml
- \* **Conjugado 10X (3A):** Un frasco conteniendo una solución de anticuerpo monoclonal anti-IgG humana marcado con peroxidasa, con estabilizadores proteicos, con Proclin 150 0,2 % V/V como conservador, concentrada 10 veces. Cod.BCH96: 2,5 ml Cod.BCH192: 3,5 ml
- \* **Diluyente de conjugado (3B):** Un frasco conteniendo solución salina proteica con Proclin150 0,2 % V/V como conservador. Agitar antes de usar. Cod.BCH96: 15 ml Cod.BCH192: 30 ml
- \* **Sustrato (4A):** Un frasco conteniendo solución de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) tamponado. Listo para usar. Cod.BCH96: 9 ml Cod.BCH192: 15 ml
- \* **Cromógeno (4B):** Un frasco conteniendo solución de 3,3', 5,5' tetrametilbencidina (TMB), estabilizada. Listo para usar. Cod.BCH96: 9 ml Cod.BCH192: 15 ml
- \* **Solución Stop (5):** Un frasco conteniendo Solución de Acido Sulfúrico 2N. Reactivo corrosivo. Listo para usar. Cod.BCH96: 15 ml Cod.BCH192: 30 ml
- \* 1 instructivo

## REACTIVOS Y MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS CON EL EQUIPO

- \* Agua destilada o desionizada
- \* Material volumétrico de vidrio
- \* Micropipetas de 10  $\mu$ l, 50 $\mu$ l, 100  $\mu$ l y 200  $\mu$ l.
- \* Incubador termostatzado a 37 °C
- \* Lector de ELISA longitud de onda 450 nm (de uso alternativo)
- \* Sistema de aspiración/lavado de policubetas con recipiente colector de desechos potencialmente infectivos.
- \* Materiales de bioseguridad
- \* Papel absorbente
- \* Cinta adhesiva (de uso alternativo)
- \* Cronómetro

## ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

Los reactivos son estables hasta la fecha que figura en la caja y frascos. Guardar los componentes del equipo entre 2 y 8 °C, siempre en posición vertical. No congelar.

Los pocillos de reacción deben conservarse herméticamente cerrados en presencia del desecante. Retirar la cantidad de pocillos necesarios para el estudio y volver a cerrar. Conservados de esta forma son estables hasta la fecha de vencimiento.

## ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Solamente para uso diagnóstico "In Vitro".
- Las muestras de sueros o plasmas humanos deben ser considerados como potenciales portadores de agentes infecciosos, por lo que se recomienda respetar las condiciones de bioseguridad en su manipulación.
- *Control Positivo y Negativo:* Estos controles se preparan a partir de suero humano no reactivo para HBsAg y para anticuerpos contra HCV y HIV, adecuadamente inactivado. Sin embargo, por ser derivados de la sangre humana deben manejarse con precaución.
- No fumar, comer o beber en el lugar de trabajo.
- Evitar las salpicaduras.
- Descontaminar los materiales utilizados. El mejor método para descontaminar los materiales y soluciones es la esterilización en autoclave durante por lo menos 1 hora a 121.5 °C. Alternativamente puede inactivarse por tratamiento con hipoclorito de sodio al 5% durante 30 minutos.
- No utilizar el equipo después de la fecha de vencimiento.
- No mezclar reactivos de lotes diferentes.
- Dejar que los reactivos alcancen la temperatura ambiente antes de su uso. Una vez utilizados, taparlos inmediatamente para evitar su contaminación y almacenarlos entre 2 y 8 °C.

## PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

**Pocillos de Reacción:** Abrir cuidadosamente el envase que contiene los Pocillos de Reacción y retirar la cantidad necesaria. En caso de usar unitariamente los pocillos, separarlos quebrando la tira. Volver a cerrar inmediatamente en presencia del desecante y almacenar entre 2 y 8 °C.

**Solución para lavado:** Diluir una parte del contenido del frasco con Solución para Lavado 25X (1) en 24 partes de agua destilada o desionizada. Homogeneizar bien. La solución final así preparada es estable 7 días conservada entre 2 y 8 °C.

**Diluyente de Muestras (2) y Diluyente de conjugado (3B):** Agitar antes de usar.

**Conjugado:** Inmediatamente antes de usar diluir una parte del contenido del frasco con Conjugado 10X (3A) en 9 partes de Diluyente de conjugado (3B). Homogeneizar.

## OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Emplear suero. La sangre se extraerá de un paciente preferentemente en ayunas siguiendo las normas generales. Procurar, en lo posible, la utilización de muestras frescas y lípidas. Las muestras pueden ser conservadas entre 2 y 8 °C hasta 48 horas, o congeladas a -20 °C para un almacenamiento prolongado. Deben evitarse los congelamientos/descongelamientos repetidos.

## PROCEDIMIENTO

1. Extraer del envase la cantidad de Pocillos de Reacción necesarios para el ensayo considerando como mínimo dos controles negativos y uno positivo.
2. Agregar a cada pocillo 200  $\mu\text{l}$  de Diluyente de Muestras (2) (ver Preparación de los Reactivos).
3. Dispensar 10 $\mu\text{l}$  de cada muestra y los controles en el Diluyente de Muestras anteriormente agregado. Luego de cada dispensado homogeneizar bien por carga y descarga de la micropipeta.
4. Aplicar sobre los pocillos movimientos circulares o pequeños golpes laterales durante 10 segundos. Sellar los pocillos con cinta adhesiva.
5. Incubar a 37 °C durante 20 minutos.
6. Descartar el contenido total de los pocillos por aspiración y lavarlos 6 veces. Para esto llenarlos con aproximadamente 300  $\mu\text{l}$ /vez/pocillo de Solución para Lavado (ver Preparación de los Reactivos) con un reposo de 60 segundos y vaciarlos cada vez por aspiración. Por último invertir los pocillos y golpearlos sobre papel absorbente para eliminar el líquido residual.
7. Dispensar en cada pocillo 100 $\mu\text{l}$  de la solución de conjugado (ver Preparación de los Reactivos).
8. Aplicar sobre los pocillos movimientos circulares o pequeños golpes laterales durante 10 segundos. Sellar los pocillos con cinta adhesiva.
9. Incubar a 37 °C durante 20 minutos.
10. Descartar la solución de conjugado y lavar 6 veces como se indicó en el punto 6.
11. Agregar a cada pocillo 50  $\mu\text{l}$  de Sustrato (4A) y a continuación 50  $\mu\text{l}$  de Cromógeno (4B). Homogeneizar bien durante 10 segundos aplicando sobre los pocillos movimientos circulares o pequeños golpes laterales
12. Incubar a temperatura ambiente (20-25 °C) y oscuridad durante 10 minutos.
13. Leer los resultados en forma visual inmediatamente ó alternativamente frenar la reacción enzimática con el agregado de 100  $\mu\text{l}$  de Solución Stop (5), homogeneizar bien durante 10 segundos y medir la Densidad Optica a 450 nm con un lector de ELISA empleando blanco de aire, dentro de los 20 minutos de agregada la solución.

### Esquema del procedimiento

Diluyente de Muestras (2) (Agitar antes de usar)	200 $\mu\text{l}$ por pocillo a utilizar.
Muestra, Control Positivo y Control Negativo.	10 $\mu\text{l}$ . Homogeneizar por carga y descarga de la micropipeta.
Homogeneizar 10 segundos e incubar 20 minutos a 37 °C.	
Lavar 6 veces con Solución para Lavado (Ver Preparación de los Reactivos)	
Solución de Conjugado (Ver Preparación de los Reactivos)	100 $\mu\text{l}$
Homogeneizar 10 segundos e incubar 20 minutos a 37 °C	
Lavar 6 veces con Solución para Lavado (Ver Preparación de los Reactivos)	
Sustrato (4A)	50 $\mu\text{l}$
Cromógeno (4B)	50 $\mu\text{l}$
Homogeneizar 10 segundos e incubar 10 minutos a temperatura ambiente y oscuridad.	
Leer inmediatamente los resultados o frenar la reacción con 100 $\mu\text{l}$ de Solución Stop(5). Homogeneizar y leer espectrofotométricamente a 450 nm contra blanco de aire.	

### INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS EN FORMA VISUAL

El Control Negativo debe ser incoloro o puede presentar una coloración celeste tenue. El Control Positivo, debido a que es de **bajo título** debe ser de color celeste diferenciable del Control Negativo.

Las muestras incoloras o con coloración celeste tenue similar a la del Control Negativo, se considerarían presumiblemente **no reactivas** para anticuerpos contra T.cruzi. Las muestras que evidencien una coloración azul o celeste claramente distinguible del Control Negativo se considerarían presumiblemente **reactivas** para anticuerpos contra T.cruzi.

### INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS CON UN LECTOR DE ELISA

Luego del agregado de la Solución Stop, homogeneizar durante 10 segundos y medir la densidad óptica (D.O.) de cada pocillo a 450 nm dentro de los 20 minutos de agregada la solución. La presencia o ausencia de anticuerpos contra Trypanosoma cruzi, debe ser analizada teniendo en cuenta el límite de decisión (cut-off value).

### **Límite de decisión o cut-off value = D.O. promedio del Control Negativo + 0.100**

Una muestra se consideraría presumiblemente no reactiva para anticuerpos contra T.cruzi si su valor de DO es menor que el valor límite de decisión.

Una muestra se consideraría presumiblemente reactiva para anticuerpos contra T.cruzi si su valor de DO es igual o mayor que el límite de decisión.

### **CRITERIO DE ACEPTABILIDAD DEL ENSAYO**

Un ensayo se considerará aceptable si:

- a) La DO promedio del Control Negativo es menor que 0.250.
- b) La DO promedio del Control Positivo es mayor o igual que el Cut-off.

Si no se cumplen las condiciones mencionadas deberá repetir el test para descartar una posible falla operativa o del funcionamiento del equipo.

### **CONCLUSIONES**

Toda muestra que ha sido reactiva en una primera prueba debería ser ensayada nuevamente para su confirmación. Si el resultado es negativo en el segundo ensayo, la muestra se consideraría no reactiva. Resultados no reproducibles en la reactividad de las muestras o de los controles podrían deberse a algunas de las siguientes causas:

- Lavado incorrecto de los pocillos.
- Contaminación de una muestra no reactiva con una muestra reactiva adyacente.
- Contaminación del Sustrato y Cromógeno con agentes oxidantes (como por ejemplo cloro).
- Mal dispensado y homogeneizado de las muestras.

### **SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD**

Por estudio de paneles internos y externos pertenecientes a instituciones de referencia, el BIOZIMA CHAGAS presentó 100% de sensibilidad asumiendo una prevalencia del 100% en la presencia de anticuerpos IgG específicos contra T.cruzi detectables por otras técnicas como IFI, HAI y AD y una especificidad superior al 99%.

### **LIMITACIONES DEL MÉTODO**

La serología sólo constituye un dato auxiliar para el diagnóstico. BIOZIMA CHAGAS, como cualquier otra técnica serológica, no puede ser concebida como un método de diagnóstico definitivo ya que éste debe basarse en la correlación de los resultados de más de un test con los datos clínicos. En ese sentido, todo resultado debe ser interpretado como una probabilidad mayor o menor de acierto en relación al caso estudiado, dentro de la población normal o parasitada.

En infecciones muy recientes (menos de 30/45 días de evolución) la técnica puede presentar resultados negativos o reactividades muy bajas.

### **BIBLIOGRAFÍA**

1. Oelemann, W.M.R. and Col.: Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of Chagas' disease. Journal of Clinical Microbiology. 36(9): 2423-2427 (1998).
2. Venkatesan, P. and Wakelin, D.: Techniques Elisas for parasitologists: or Lies, Damned Lies and Elisas. Parasitology Today 9(6): 228-232 (1993).
3. Cantarero, L.A.; Butler, J.E. and Osborne, J.W.: The adsorptive characteristics of proteins for polystyrene and their significance in solid-phase immunoassays. Analytical Biochemistry 105: 375-382 (1980).
4. Hillyer, G.V. and Kagan, I.G.: New advances in the immunodiagnosis of parasitic infections. I. The enzyme-linked immunosorbent assay. Bol. Asoc. Med. P. Rico 71(10): 366-377 (Octubre 1979).
5. Voller, A.; Bidwell, D.E. and Bartlett, A.: The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): a guide with abstracts of microplate applications. Fowline Press, Guernsey, Channel Islands 1-125 (1979).
6. Engvall, E.; Perlmann, P.: Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. The Journal of Immunology. 109(1): 129-135 (July 1972).

### **LABORATORIO LEMOS S.R.L.**

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

Producción, Administración y Ventas:

Santiago del Estero 1162

(C1075AAX) Buenos Aires. Argentina.

Telefax: 4304-2204/2374

Producto para diagnóstico autorizado por el M.S. Certificado N° 000142/93, Disp. N° 3203/03 Disp. N° 1487/05. Industria Argentina.