

DISTRIBUITO DA:

effegiemme
diagnostici

Chagatest

ELISA recombinante v.4.0 Cat . N° 1.293.257

Enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to Trypanosoma cruzi

SINTESI

La malattia di Chagas è un'infezione parassitaria causata da Trypanosoma cruzi . La diagnosi di laboratorio dipende dallo stadio della malattia . Durante la fase acuta , la diagnosi viene effettuata mediante identificazione di parassiti nel sangue o di metodi immunologici che rilevano IgM . Durante la fase cronica , possono essere usati metodi immunologici , quali emoagglutinazione , immunofluorescenza e immunoenzimatici o western blot .

PRINCIPIO DEL TEST

Chagatest ELISA recombinante v.4.0 è un "in vitro" immunoenzimatico per la determinazione qualitativa degli anticorpi anti- T. cruzi in campioni di siero o plasma umano. Il campione viene diluito nel pozzetto in cui sono immobilizzati sei antigeni ricombinanti (SAPA, 1, 2, 13, 30 e 36). Questi antigeni sono da proteine specifiche di epimastigote e trypomastigote fasi del cruzi T., corrispondenti a zone altamente conservate tra i diversi ceppi. Se il campione contiene anticorpi specifici, essi si legano agli antigeni. Gli anticorpi non legati vengono eliminati con il lavaggio. Poi, il coniugato viene aggiunto (anticorpi monoclonali umani anti-IgG coniugati a perossidasi), che reagisce specificamente con immunocaptured anti-T. anticorpi cruzi. Il coniugato non legato viene rimosso mediante lavaggio. La presenza di perossidasi legata al complesso è riconosciuta mediante l'aggiunta di un substrato cromogeno, tetrametilbenzidina. I campioni reattivi sviluppano un colore azzurro. La reazione enzimatica viene fermata mediante aggiunta di acido solforico, il colore blu vira in giallo. La densità ottica è misurata bicromaticamente a 450 / 620-650 nm o monocromatica a 450 nm.

REAGENTI FORNITI

Piastra di microtitolazione 96 pozzetti rivestiti con antigeni ricombinanti di Trypanosoma cruzi. Diluente del campione : tampone salina con tensioattivo . colore viola . Coniugato concentrato: anticorpi monoclonali umani contro il IgG coniugato a perossidasi (10x) . Colore rosso. Diluente del Coniugato : tampone salina con le proteine .
Substrato : tetrametilbenzidina e soluzione di perossido di idrogeno . Tappo: 2 N acido solforico . R36 / 38 : irritante per gli occhi e la pelle . S24 / 25 : evitare il contatto con gli occhi e la pelle . S26 / 28 : in caso di contatto con gli occhi e la pelle , lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare un medico . S37 : usare i guanti adeguati .
Tampone Concentrato di lavaggio : tampone salina con tensioattivo (25x) . Colore verde.
Controllo positivo : inattivato siero umano contenente anticorpi Trypanosoma cruzi . Colore arancione.
Controllo negativo : inattivato non reattivo siero umano . Colore giallo.

Reagenti non FORNITI

Acqua distillata o deionizzata

MATERIALE RICHIESTO (non fornito) –

Micropipette per misurare i volumi indicati - punte monouso - materiale volumetrico per preparare diluizioni indicate - 37 ° C incubatore - assorbente di carta - Guanti monouso - Timer o cronometro - ipoclorito di sodio - microtitolazione sistema di lavaggio piatto (manuale o automatico) - spettrofotometro per la lettura piastre di micro titolazione

AVVERTENZE

- I reagenti sono per uso diagnostico "in vitro". - Tutti i campioni dei pazienti devono essere manipolati come in grado di trasmettere l'infezione. - I sieri di controllo sono stati testati per l'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg) e anticorpi per il virus dell'epatite C (HCV) e virus dell'immunodeficienza umana (HIV) e sono risultati non reattivi. Tuttavia devono essere trattati come materiale potenzialmente infettivo. - Tutti i materiali utilizzati per eseguire il test devono essere distrutti per garantire l'inattivazione degli agenti patogeni. Il metodo consigliato è in autoclave per un'ora a 121°C. I rifiuti liquidi possono essere disinfettati con ipoclorito di sodio (5%) per almeno 60 minuti. - Non scambiare reagenti di lotti diversi. - Non usare reagenti di altra origine. - Evitare di toccare le pareti dei pozzetti con le punte. - Le piastre di microtitolazione devono essere incubate in termostato. Non usare bagnomaria. Non aprire il

termostato durante questo processo. - Evitare il contatto dei reagenti con vapori di ipoclorito, dal momento che l'ipoclorito inibisce la reazione. - Evitare il contatto dell'acido solforico con la pelle e gli occhi. In questo caso, lavare immediatamente con abbondante acqua. - Evitare la fuoriuscita di liquidi e la formazione di spray. - Non pipettare con la bocca. Utilizzare guanti monouso e protezioni per gli occhi durante la manipolazione dei campioni e dei reagenti. - Tutti i reagenti e i campioni devono essere smaltiti in conformità alle normative vigenti.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Tutto il materiale utilizzato per la preparazione dei reagenti deve essere pulito e privo di detersivo e ipoclorito .
 Wash Buffer : i costituenti del reagente concentrato possono precipitare a bassa temperatura . In tal caso portare la soluzione a 37 ° C fino a completa dissoluzione . Per ottenere un buffer pronto uso diluire 1 parte di tampone di lavaggio concentrato (25x) con 24 parti di acqua distillata o deionizzata . Esempio : 20 ml con 480 ml di acqua distillata .
 Coniugato: diluire 1 parte di coniugato concentrato (10x) con 9 parti di diluente del coniugato .
 Esempio : vedi tabella

N° di pozzetti	coniugato concentrato	Coniugato diluente
8	100 ul	0,9 ml
16	200 ul	1,8 ml
24	300 ul	2,7 ml
32	400 ul	3,6 ml
96	1200 ul	10,8 ml

Pronti all'uso: Micropiastre , diluente del campione , diluente del coniugato , substrato , Stopper , controlli negativi e positivi .

STABILITA' E CONSERVAZIONE

I reagenti forniti sono stabili a 2-10°C fino alla data di scadenza indicata sulla scatola . Non congelare.
Tampone concentrato di lavaggio e stopper: possono essere conservati a temperatura ambiente(2-25°C) .
Tampone di lavaggio : una volta diluito è stabile per 3 mesi a temperatura ambiente (2-25°C) .
Coniugato : una volta diluito è stabile per 6 ore a temperatura ambiente (2-25°C) .
Piastra microtitolazione rivestita: non aprire la busta per l'esecuzione del test fino a quando non ha raggiunto la temperatura ambiente, I pozzetti non utilizzati devono essere conservati nel sacchetto con l'essiccante , sigillati e conservati a 2-10°C . Le strisce per test conservate in questo modo sono stabili per 4 mesi se non si supera la data di scadenza..

CAMPIONE

Campione di siero o plasma

a) La raccolta del campione: come di consueto .

b) Additivi : non richiesti per il siero . Il plasma va raccolto con EDTA , eparina o citrato di sodio come anticoagulanti .

c)Sostanze interferenti : nessuna interferenza è stata osservata con bilirubina fino a 42 mg / dl , acido ascorbico fino a 50 mg / dl , trigliceridi fino a 1600 mg / dl , emoglobina fino a 290 mg / dl .

I campioni che contengono particelle devono essere chiarificati per centrifugazione .

d) istruzioni stabilità e stoccaggio : i campioni devono essere conservati a 2-10°C . Se non si effettua il test entro 72 ore , i campioni devono essere congelati a -20 ° C.

I campioni non devono essere più volte congelati e scongelati . Questo può portare a risultati errati . Nel caso di utilizzo di campioni congelati , devono essere omogeneizzati e centrifugati prima dell'uso, l'inattivazione al calore può influenzare il risultato . Non utilizzare campioni con contaminazione microbica . Se i campioni devono essere trasportati , devono essere confezionati secondo le norme locali per la spedizione di materiale a rischio biologico .

PROCEDIMENTO

1- Portare i reagenti e i campioni a temperatura ambiente prima dell'apertura.

2- Preparare il volume necessario di tampone di lavaggio diluito.

3- Posizionare i pozzetti necessari nel supporto della striscia per il numero di determinazioni da utilizzare, tra cui 2 pozzetti per il controllo positivo (PC) e 3 per il controllo negativo (NC).

4- Distribuire il diluente del campione, il campione (S) ed i controlli secondo il seguente schema:

	S	PC	NC
diluente campione	100 ul	100 ul	100 ul
controllo positivo		20 UL	
Controllo negativo			20 ul
campione	20 ul		

Verificare il funzionamento della micropipetta. Quando si aggiunge il campione, il diluente cambierà colore come segue: campione solo diluente – viola, campione di siero o plasma - blu chiaro, controllo pos.- arancione, controllo neg. – verde. Attenzione: campioni torbidi o emolizzati possono cambiare il colore finale senza influenzare i risultati . Il cambiamento di colore può dipendere dal volume del campione aggiunto e la dalla sua composizione. Un cambiamento di colore meno intenso può essere dovuto ad un volume di campione inferiore, o ad un basso livello di proteine.

5- per evitare l'evaporazione, coprire la piastra con il nastro adesivo fornito e incubare per 60 ± 2 minuti a 37 ± 1 ° C. Allo stesso tempo, preparare il coniugato diluito (vedi REAGENTI PREPARAZIONE).

- 6- Il liquido da ciascun pozzetto deve essere completamente rimosso dopo incubazione. Lavare 5 volte in base alle istruzioni di lavaggio (vedi procedura di lavaggio).
- 7- Aggiungere il Coniugato: coniugato diluito distribuire 100 ul. Per evitare l'evaporazione coprire la micropiastra
- 8- Incubare per 30 ± 2 minuti a 37 ± 1 ° C .
- 9- Lavare 5 volte secondo le istruzioni di lavaggio .
- 10- Dispensare il substrato . Trasferire in un recipiente pulito solo il volume richiesto. Non trasferire il substrato residuo nel flaconcino originale .
- Evitare il contatto dei reagenti con agenti ossidanti . Substrato distribuire 100 ul
- 11- incubare per 30 ± 2 minuti a temperatura ambiente (18-25°C) , proteggere dalla luce
- 12- Aggiungere Stopper 100 ul
- 13- Leggere l'assorbanza in spettrofotometro bicromatismo a 450 / 620- 650 nm o monocromatismo 450 nm .
- Nota : Si consiglia la lettura bicromatica . Nel caso la lettura sia monocromatica , eseguire un bianco reagente che dovrà essere sottratto da tutti i valori campione ..

Il colore REAZIONE è stabile per 10 minuti quindi i risultati devono essere letti entro questo periodo.

PROCEDURA DEL LAVAGGIO

Rimuovere il liquido dai pozzetti tramite aspirazione o di inversione della piastra. I pozzetti vengono lavati con 300 ul tampone di lavaggio diluito. Durante il riempimento dei pozzetti fare attenzione a non versare. La soluzione di lavaggio deve essere a contatto con i pozzetti per 30 - 60 secondi. Assicurarsi che nessun liquido residuo rimanga dopo la fase di lavaggio finale. Eseguire doppia aspirazione per rimuovere l'eccesso di buffer. Se dopo tale procedura persiste ancora, capovolgere la piastra su carta assorbente e toccare più volte.

Nota: la procedura di lavaggio è fondamentale per il risultato del test. Se il tampone di lavaggio in eccesso rimane nei pozzetti o se i pozzetti non sono completamente riempiti, si possono ottenere risultati errati. Non lasciate che i pozzetti rimangano asciutti durante la procedura.

SINTESI DELLA PROCEDURA

STAGE	PROCEDURE	WARNINGS/OBSERVATIONS
Dilution	Prepare Wash solution	Dissolve salt crystals
Sample Diluent	Add 100 ul Sample Diluent in each well	
Samples	Add 20 ul S, PC and NC	Color change is observed when adding the sample and controls
Incubation	Cover the wells and incubate for 60 ± 2 minutes at 37 ± 1 °C	In incubator
Washing step	Wash each well with 300 ul diluted Wash Buffer (5 times)	Time of contact of the Wash solution from 30 to 60 seconds. Completely remove the residual liquid from the wells
Dilution	Conjugate	During incubation with the sample, dilute the Concentrated Conjugate (10x)
Conjugate	Add 100 ul diluted Conjugate	
Incubation	Cover the wells and incubate for 30 ± 2 minutes at 37 ± 1 °C	In incubator
Washing step	The same as above	
Substrate	Add 100 ul Substrate	Transfer the required Substrate volume to be used. Do not pipette from the original bottle. Discard the remaining reagent. Avoid contact with oxidizing agents.
Incubation	30 ± 2 minutos at 18-25°C	Maintain the wells protected from light
Stop	Add 100 ul Stopper	
Reading	Read in spectrophotometer	Read within 10 minutes

CRITERI DI CONVALIDA DEL TEST

Il test è considerato valido se le seguenti condizioni sono soddisfatte contemporaneamente:

1- La densità ottica media (O.D.) dei controlli negativi deve essere inferiore o uguale a 0.100.

Esempio: lettura 1 = 0,034; Lettura 2 = 0,028; Lettura 3 = 0,029 Media = (0,034 + 0,028 + 0,029) / 3 = 0,030

2- Eliminare qualsiasi controllo negativo con O.D. maggiore di 0.100.

3- In caso di controllo negativo rimosso, ricalcolare la media. Un saggio è valido se almeno due dei controlli negativi sono accettati.

4- Il O.D. media dei controlli positivi deve essere maggiore o uguale a 1.300.

Esempio: lettura 1 = 1.697; Lettura 2 = 1.774 Media = (1.697 + 1.774) / 2 = 1.736

5- Il O.D. differenza media dei controlli positivi e negativi dovrebbe essere maggiore o uguale a 1.200. Nel caso in cui una delle condizioni di cui sopra non sia soddisfatta, ripetere il test. Ricordare che le letture ottenute dipenderanno dalla sensibilità dello strumento utilizzato.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

a) con strumenti ottici

la presenza o l'assenza di anticorpi anti-T. cruzi è determinato associando l'assorbanza del campione con il valore di cut-off.

$$\text{Cut-off} = \text{NC} + 0.200$$

NC: O.D media del negativo

Esempio: 0.030 + 0.200 = 0.230

Campioni non reattivi: i campioni con assorbanza inferiori al valore di cut-off.

Campioni reattivi: campioni con assorbanza maggiore o uguale al valore di cut-off.

b) Interpretazione visiva

Se si seleziona questo tipo di interpretazione, ogni campione che non presenta un' intensità di colore maggiore rispetto ai controlli negativi deve essere considerato non reattivi. In caso contrario un campione evidentemente giallo è considerato reattivo.

Per maggior sicurezza tutti i campioni reattivi devono essere ripetuti per duplicato. Se una o entrambe le ripetizioni sono reattive, è da considerare reattivo. Un campione inizialmente reattivo può essere non reattivo in entrambe le ripetizioni. Ciò può essere dovuto a:

- La contaminazione trasversale di un campione reattivo con un campione non reattivo.

- Contaminazione del campione durante la dispensazione, imprecisione nel campione, coniugato e / o substrato dispensazione nel pozzetto

- Puntale riutilizzato. - La contaminazione con ipoclorito o altri agenti ossidanti.

In alcuni casi, un campione non reattivo può produrre una reazione falsamente reattiva, sia nell'analisi iniziale che nelle sue ripetizioni. Alcune cause probabili di questo effetto possono essere:

- la contaminazione del campione durante la raccolta, il trattamento o la conservazione. - Presenza di sostanze interferenti, quali autoanticorpi, droghe, ecc – dispensazione inefficace e / o aspirazione della soluzione di lavaggio

LIMITAZIONI

Vedere sostanze interferenti conosciute. Non utilizzare campioni aggregati. Non utilizzare altri fluidi corporei come la saliva, liquido cerebrospinale o urine.

CARATTERISTICHE SPECIFICHE

a) Sensibilità

- Sensibilità clinica in pannelli di prestazione: in uno studio condotto sui diversi pannelli commerciali internazionali, sono stati ottenuti i seguenti risultati:

PMT 201 (Anti-T pannello cruzi prestazioni, BBI, USA): sono stati rilevati 14 su 14 campioni reattivi.

PP 0404 (Pannello di prestazioni per Chagas, Pannello di Q, Brasile): sono stati rilevati 16 su 16 campioni reattivi.

PP 0405 (Pannello di prestazioni anti-T cruzi, Q Panel, Brasile.): sono stati rilevati 16 su 16 campioni reattivi.

- Sensibilità clinica in uno studio condotto su 100 campioni in bambini dalle regioni endemiche con infezione T. cruzi, confermata con metodi diversi, tutti i campioni sono risultati reattivi con il kit ELISA v.4.0 Chagatest recombinante.

In uno studio di 116 campioni reattivi di un istituto ospedaliero, sono stati rilevati 115 campioni positivi.

b) Specificità

In uno studio effettuato su 1192 campioni di siero e plasma da banche del sangue, la specificità ottenuta è stata 99,66%.

In un altro studio su 477 campioni di siero e plasma provenienti da due diverse istituzioni sanitarie, è stata ottenuta una specificità del 99,57%. Nel corso di un panel di 474 plasmi da una popolazione ad elevata prevalenza, la specificità ottenuta è 98,30%.

Una possibile cross-reattività è stata valutata analizzando campioni di 491 individui con differenti condizioni cliniche che possono essere la causa di reazioni non specifiche per il test ELISA v.4.0 Chagatest recombinante. Queste condizioni includono le donne in gravidanza, pazienti emodializzati, pazienti con malattie autoimmuni o malattie infettive diverse dal Chagas (HIV, HTLV, l'epatite C, l'epatite B, la sifilide, altri). Per questa popolazione la specificità era 98,37%.

c) Precisione

La precisione di test è stata valutata seguente EP5 - Un protocollo raccomandato dal NCCLS. I saggi sono stati eseguiti con campioni aventi diversi livelli di reattività. I campioni sono stati eseguiti in doppio tutti i giorni per 20 giorni.

Media intra-test

	Mean (O.D.)	Intra-assay		Total	
		S.D.	C.V.	S.D.	C.V.
Sample 1	0.360	0.029	8.07%	0.043	11.90%
Sample 2	0.550	0.036	6.55%	0.055	10.01%
Sample 3	0.870	0.063	7.23%	0.093	10.69%
(+) Control	1.750	0.085	4.83%	0.138	7.89%
(-) Control	0.028	0.003	10.35%	0.004	14.24%

Si raccomanda di controllare qualsiasi risultato positivo con ulteriori test diagnostici. L'Istituto " Fatała Chabén " raccomanda che l'infezione deve essere diagnosticata con un altro metodo tra: immunofluorescenza indiretta, emoagglutinazione indiretta e western blot

REFERENCES

- Frasch, A.; Reyes, M. - Parasitol. Today 6/4, 1990.
- Affranchino, J. et al. - Mol. Biochem. Parasitol. 34:221, 1989.
- Pastini, A.C.; Iglesias, S.R.; Carricarte, V.C.; Guerin, M.E.; Sánchez, D.O.; Frasch, A.C. - Clin. Chem. 40/10:1893, 1994.
- Iglesias, S.R. - Instituto de Investigaciones Bioquímicas «Fundación Campomar», Buenos Aires, 1991.
- Knecher, L.M.; Rojkin, L.F.; Capriotti, G.A.; Lorenzo, L.E. - Int. J. Parasitol. 24/2: 207-211 (1994).
- Umezawa, E.S.; Nascimento, M.S.; Kesper, N. Jr; Coura, J.R.; Borges-Pereira, J.; Junqueira, A.C.V.; Camargo, M. - J. Clin. Microbiol. 34/9: 2143-2147 (1996).
- Umezawa, E.S.; da Silva, J.F. - Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 94/1:285-288 (1999).
- Berrizbeitia, M.; Ndao, M.; Bubis, J.; Gottschalk, M.; Aché, A.; Lacouture, S.; Medina, M.; Ward, B. - J. Clin. Microbiol. 44/2:291-296 (2006).
- Ministerio de Salud y Acción Social, Instituto Nacional de Parasitología «Doctor Mario Fatała Chabén» - Normas para el diagnóstico de la infección chagásica - Resolución ministerial 523/97, 1998.
- Capriotti, G.A.; Felcaro, M.V.; Toplikar, E.M.; Gariglio, R.C. - 52° Annual Meeting AACC, San Francisco, CA - Clin. Chem. 46/S6:A51, Abs 190A, 2000.
- Pirard, M.; Iihoshi, N.; Boelaert, M.; Lasanta, P.; López, F.; Van der Stuyft, P. - Transfusion 45: 554-561 (2005).
- Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices - Approved Guideline EP5-A 19/2 (1999). 2000 Rosario - Argentina

Produttore:

Wiener lab. Wiener Laboratorios S.A.I.C.

Riobamba 2944 2000 - Rosario - Argentina

A.N.M.A.T. Registered product Cert. N°: 6095/07



This product fulfills the requirements of the European Directive 98/79 EC for "in vitro" diagnostic medical devices



Authorized representative in the European Community



"In vitro" diagnostic medical device



Contains sufficient for <n> tests



Use by



Temperature limitation (store at)



Do not freeze



Biological risks



Volume after reconstitution



Contents



Batch code



Manufactured by:



Harmful



Corrosive / Caustic



Irritant



Consult instructions for use



Calibrator



Control



Positive Control



Negative Control



Catalog number