



Chagatest

ELISA recombinante v.3.0

Método de 3ª generación para la detección de anticuerpos
contra el *Trypanosoma cruzi*

SIGNIFICACION CLINICA

La enfermedad de Chagas es una infección parasitaria producida por el *Trypanosoma cruzi*. El diagnóstico de laboratorio depende del estadio en el cual se encuentre la enfermedad. Durante la fase aguda, se efectúa directamente mediante la comprobación de los parásitos en sangre o por métodos inmunológicos que detecten IgM. Durante la fase crónica, se pueden usar métodos inmunológicos como: reacción de fijación de complemento, aglutinación de látex, floculación, hemaglutinación, aglutinación directa, inmunofluorescencia o ELISA.

FUNDAMENTOS DEL METODO

En esta técnica cualitativa para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi*, la muestra se diluye en el soporte en el que se encuentran inmovilizados antígenos recombinantes (1, 2, 13, 30, 36 y SAPA), obteniéndose un método de 3ª generación. Estos antígenos se obtienen por técnica de ADN recombinante a partir de proteínas específicas de los estadios epimastigote y tripomastigote del *T. cruzi*, correspondientes a zonas altamente conservadas entre distintas cepas. La tecnología empleada permite asegurar una mezcla antigénica de composición conocida y constante lote a lote, brindando resultados reproducibles, específicos y con una elevada sensibilidad. Si la muestra contiene los anticuerpos específicos, éstos formarán un complejo con los antígenos y permanecerán unidos al soporte. La fracción no unida se elimina por lavado tras lo que se agregan anticuerpos anti-inmunoglobulina humana conjugados con peroxidasa. Si se produjo la reacción en la primera etapa del proceso, se unirá el conjugado. Luego de un nuevo lavado se agrega el sustrato enzimático. En los casos en que se haya unido el conjugado habrá aparición de color celeste. La reacción se detiene con ácido sulfúrico, con lo que el color celeste vira al amarillo.

REACTIVOS PROVISTOS

Policubeta sensibilizada: policubeta de tiras removibles con pocillos que contienen antígenos recombinantes de *T. cruzi* inmovilizados.

Conjugado: anti-inmunoglobulinas humanas (cabra) conjugadas con peroxidasa.

Revelador A: peróxido de hidrógeno 60 mmol/l en buffer citrato 50 mmol/l pH 3,2.

Revelador B: tetrametilbencidina (TMB) 0,01 mol/l en ácido clorhídrico 0,1 N.

Stopper: ácido sulfúrico 2 N.

Buffer de Lavado concentrado: cloruro de sodio 1,4 mol/l

en buffer fosfatos 100 mmol/l y tensioactivo no iónico 0,1 g/l.

Diluyente de Muestras: albúmina bovina en solución fisiológica tamponada con buffer fosfatos pH 7,2.

Control Positivo: dilución de suero inactivado conteniendo anticuerpos contra el *Trypanosoma cruzi*.

Control Negativo: dilución de suero no reactivo, inactivado.

INSTRUCCIONES PARA SU USO

Buffer de Lavado: para usar diluir 1+4 con agua destilada (1 parte de Buffer de Lavado concentrado + 4 partes de agua destilada). A baja temperatura los componentes del reactivo pueden precipitar. En tal caso, colocar en baño de agua a 37°C unos minutos, mezclando luego por inversión.

Policubeta sensibilizada, Conjugado, Revelador A, Revelador B, Stopper: listos para usar.

Diluyente de Muestras: listo para usar. Su color puede variar de lote a lote sin que se afecte la capacidad reaccional del mismo.

Control Positivo y Control Negativo: listos para usar.

PRECAUCIONES

- Todas las muestras de pacientes deben manipularse como si fueran capaces de transmitir infección. Los controles se encuentran inactivados. Sin embargo, deben emplearse como si se tratara de material infeccioso.
- Los sueros controles han sido examinados para antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg), virus de inmunodeficiencia humana (HIV) y hepatitis C encontrándose no reactivos.
- Todos los materiales empleados en el ensayo deben ser destruidos a fin de asegurar la inactivación de agentes patógenos. El método recomendado para este procedimiento es autoclavar durante 1 hora a 121°C. Los líquidos de desecho pueden ser desinfectados con hipoclorito de sodio (concentración final 5%) durante por lo menos 60 minutos.
- No intercambiar reactivos de distintos equipos y lotes.
- No emplear reactivos de otro origen.
- Las policubetas deben incubarse en estufa. No usar baño de agua. Debe evitarse abrir la estufa durante este proceso.
- Evitar que los vapores de hipoclorito provenientes de los recipientes para desechos biológicos u otras fuentes entren en contacto con la policubeta, ya que el hipoclorito afecta la reacción.
- Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro".
- Evitar el contacto del ácido sulfúrico con la piel y mucosas. H315 + H320: Provoca irritación cutánea y ocular. H314: Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. P262: Evitar el contacto con los ojos, la piel o la ropa. P305 + P351 + P338: EN CASO DE CONTACTO

CON LOS OJOS: Enjuagar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir enjuagando. P302 + P352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes. P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Los **Reactivos Provistos** son estables en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja. No congelar.

Buffer de Lavado: estable 3 meses a temperatura ambiente.

Policubeta sensibilizada: las tiras de pocillos con antígeno inmovilizado se proveen cerradas al vacío y con desecante. No abrir el envoltorio hasta el momento de usar, ni antes que haya tomado temperatura ambiente, de lo contrario se favorecerá la humectación del contenido. Las tiras de pocillos no utilizadas deben conservarse dentro del sobre con el desecante, cerrado y a 2-10°C. Las tiras conservadas en estas condiciones pueden ser utilizadas dentro de los 5 meses posteriores mientras no se supere la fecha de vencimiento del equipo.

MUESTRA

Suero o plasma

a) Recolección: obtener de la manera usual. No usar muestras inactivadas por calor. VER LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO.

b) Aditivos: no se requieren para suero. Si se emplea plasma puede utilizarse cualquier anticoagulante de uso corriente en la práctica transfusional.

c) Sustancias interferentes conocidas: la hemólisis, hiperlipemia y otras causas de turbiedad pueden provocar resultados erróneos. Estas muestras deben ser clarificadas por centrifugación.

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: las muestras no diluidas pueden conservarse durante 7 días a 2-10°C. Para conservación por períodos más prolongados, deben ser congeladas a -20°C o menos. Evitar los congelamientos y descongelamientos reiterados. Existen evidencias que muestran que los congelamientos sucesivos pueden ser causas de resultados erróneos. Si las muestras deben ser transportadas, embalar de acuerdo a las especificaciones legales relativas al envío de materiales infecciosos.

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Micropipetas capaces de medir los volúmenes indicados.
- Reloj alarma o cronómetro.
- Estufa a 37°C
- Espectrofotómetro para lectura de policubetas (opcional).

CONDICIONES DE REACCION

- Longitud de onda primaria: 450 nm
- Longitud de onda secundaria (bicromática): 620-650 nm
- Calibración del instrumental: llevar a cero el espectrofotómetro con Blanco de Reactivos procesándolo de la misma forma que una determinación pero omitiendo colocar Muestra.
- Tiempo de reacción: 90 minutos

- Temperatura de reacción: 37°C y temperatura ambiente
- Volumen de muestra: 10 ul

PROCEDIMIENTO

Llevar a temperatura ambiente los reactivos y las muestras antes de iniciar la prueba. Una vez iniciado el procedimiento debe completarse sin interrupción.

Procesar simultáneamente 2 Controles Positivos (CP) 3 Negativos (CN) y los Desconocidos (D). Al depositar la muestra y/o Controles sobre el Diluyente de Muestras, debe asegurarse de colocar los mismos en el seno del líquido y no sobre las paredes o el fondo del pocillo. Enjuagar la pipeta con el Diluyente dispensado en el pocillo para asegurar la correcta homogeneización.

En los pocillos a utilizar de la policubeta colocar:

	D	CP	CN
Diluyente de Muestras	200 ul	200 ul	200 ul
Control Positivo	-	10 ul	-
Control Negativo	-	-	10 ul
Muestra	10 ul	-	-

Mezclar aplicando suaves golpes en los laterales de la policubeta durante 10 segundos una vez cargadas las muestras en cada tira. Para evitar la evaporación, cubrir la placa e incubar en la estufa 30 minutos a 37°C. Luego aspirar cuidadosamente el líquido de cada pocillo recibiendo en un recipiente para desechos biológicos que contenga 5% de hipoclorito sódico. A continuación, lavar 5 veces con Buffer de Lavado empleando aproximadamente 300 ul/vez/pocillo. Después de cada lavado, el líquido se descartará también en el recipiente con hipoclorito. Opcionalmente, emplear lavador automático. Al finalizar el último lavado, eliminar por completo el líquido residual, invirtiendo la policubeta y golpeándola varias veces sobre papel absorbente, ejerciendo una leve presión con la mano sobre los laterales mayores del soporte, para evitar la caída de las tiras de pocillos. Luego agregar en cada pocillo:

Conjugado	1 gota	1 gota	1 gota
------------------	--------	--------	--------

En caso de utilizar micropipeta automática, dispensar 50 ul.

Mezclar aplicando suaves golpes en los laterales de la policubeta durante 10 segundos. Para evitar la evaporación, cubrir la placa e incubar durante 30 minutos en estufa a 37°C. Luego aspirar el líquido de los pocillos, recibiendo en el recipiente con hipoclorito y lavar según se indicó más arriba. Al finalizar el último lavado, eliminar por completo el líquido residual, invirtiendo la policubeta y golpeándola varias veces sobre papel absorbente, ejerciendo una leve presión con la mano sobre los laterales mayores del soporte, para evitar la caída de las tiras de pocillos. Luego agregar en cada pocillo:

Revelador A	1 gota	1 gota	1 gota
--------------------	--------	--------	--------

Revelador B	1 gota	1 gota	1 gota
En caso de utilizar micropipeta automática, dispensar 50 ul. Mezclar aplicando suaves golpes en los laterales de la policubeta durante 10 segundos. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente y luego agregar:			
Stopper	1 gota	1 gota	1 gota
En caso de utilizar micropipeta automática, dispensar 50 ul. Mezclar aplicando suaves golpes en los laterales de la policubeta durante 10 segundos. Leer en espectrofotómetro a 450 nm o bicromática a 450/620-650 nm o evaluar el resultado a simple vista por comparación con los Controles Positivos y Negativos.			

ESTABILIDAD DE LA MEZCLA DE REACCION FINAL

El color de la reacción es estable durante 30 minutos, por lo que los resultados deben observarse durante ese lapso.

CRITERIOS DE VALIDACION DE LA CORRIDA

La corrida se considera válida si se cumplen simultáneamente las siguientes condiciones:

a) Las lecturas de al menos 2 de los 3 Controles Negativos corregidas contra el Blanco de Reactivos deben ser menores o iguales a 0,150 D.O.

b) La lectura media de los Controles Positivos corregida debe ser mayor o igual a 0,600 D.O.

Si una o ambas condiciones no se cumple, repetir la corrida. Para ambos casos recordar que las lecturas obtenidas dependerán de la sensibilidad del aparato empleado.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

a) Con instrumental óptico:

La presencia o ausencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* se determina relacionando la absorbancia de la muestra respecto al valor Cut-off.

Cut-off = CN + 0,300 D.O.

donde CN: promedio de las lecturas del Control Negativo
Zona de indeterminación: Cut-off $\pm$ 10%

Muestras No Reactivas: se consideran aquellas con absorbancias menores al límite inferior de la zona de indeterminación.

Muestras Reactivas: se consideran aquellas con absorbancias mayores al límite superior de la zona de indeterminación.

Muestras Indeterminadas: se consideran aquellas con absorbancias que caen dentro de la zona de indeterminación. Estas muestras deben ser ensayadas nuevamente.

b) Interpretación visual:

Si se opta por este tipo de interpretación debe considerarse No Reactiva toda muestra que no presente una coloración mayor que la de los Controles Negativos. Por el contrario, una muestra netamente amarilla se considera Reactiva.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA.

- Constituyen causas de resultados erróneos:
Lavado incorrecto de los pocillos de reacción. Contaminación cruzada de muestras No Reactivas con anticuerpos procedentes de una muestra Reactiva.
Contaminación de la solución cromogénica con agentes oxidantes (cloro, etc.).
Contaminación del Stopper.
Conservación inadecuada de las tiras de pocillos no utilizadas.
Utilizar baño de agua para la incubación.
Contaminación del Buffer de Lavado diluido. Se recomienda verificar la limpieza de los recipientes donde se prepara y almacena. Si se observa aparición de turbidez o precipitado al prepararlo, debe desecharse.
- Un resultado negativo no excluye la posibilidad de exposición o infección por *T. cruzi*.
- Ocasionalmente, al efectuar lecturas bicromáticas, pueden obtenerse absorbancias negativas que no invalidan la determinación. Esto se debe a que algunas muestras dan lecturas inferiores al Blanco de Reactivos.
- Dependiendo de la sensibilidad del espectrofotómetro utilizado, se encuentran muestras que pueden dar valores por encima del rango numérico de lectura. Estos resultados deben interpretarse como reactivos. En estos casos particulares, para obtener valores numéricos, puede efectuarse la lectura a 490 nm o 490/650 nm.
- No utilizar muestras inactivadas por calor ya que pueden ocasionar resultados falsos positivos.
- Verifique que el sistema lavador que está usando (WIENER WASHER u otro) aspire totalmente el contenido de los pocillos y que el volumen de la solución lavadora dispensada sea pareja.

DESEMPEÑO

a) Sensibilidad: sobre un panel de 70 muestras con xenodiagnóstico y serología positivos la sensibilidad es del 100%. Sobre otro panel de 144 muestras con serología positiva con métodos de hemaglutinación indirecta, inmunofluorescencia indirecta y otros ELISA, la sensibilidad es del 99,3%.

b) Especificidad: sobre un panel de 75 muestras con xenodiagnóstico y serología negativos, la especificidad es del 98,7%.

Sobre otro panel de 200 muestras con serología negativa por métodos de hemaglutinación indirecta, inmunofluorescencia indirecta y otros ELISA, la especificidad es del 100%.

c) Estudio poblacional: en una población general que incluye individuos sanos, donantes, chagásicos y con otras patologías, la correlación con respecto a métodos confirmatorios, fue del 99,6%.

No obstante la sensibilidad del método, sus resultados, al igual que los de cualquier método serológico, sólo constituyen un dato auxiliar para el diagnóstico. Es por esta razón que los informes deben ser considerados en términos de probabilidad. En este caso, mayor o menor probabilidad de parasitosis por *T. cruzi*.

Cualquier resultado Reactivo debe ser verificado por otra técnica. Recordar el criterio recomendado por el Instituto Fatale Chaben, según el cual el inmunodiagnóstico de la in-

fección deberá hacerse con un mínimo de 2 de los siguientes métodos: inmunofluorescencia indirecta, hemaglutinación indirecta, ELISA, aglutinación de partículas (látex), debidamente validados por el Centro Nacional de Referencia.

PRESENTACION

Kit para 96 determinaciones (Cód. 1293254).

BIBLIOGRAFIA

- 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).
- Knecher, L.M.; Capriotti, G.A.; Rojkin, L.F.; Lorenzo, L.E.- Rev. Asoc. Bioq. Arg. 58/3:125, 1994.
- Ministerio de Salud y Acción Social, Instituto Nacional de Parasitología "Doctor Mario Fatala 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.

EXPLICACION DE LOS SIMBOLOS

Policubeta	Sensib.
-------------------	----------------

Policubeta sensibilizada

Conjugado

Conjugado

Revelador	A
------------------	----------

Revelador A

Control	+
----------------	----------

Control Positivo

Stopper

Stopper

Diluyente	Muestra
------------------	----------------

Diluyente de Muestra

Buf. Lavado	Conc
--------------------	-------------

Buffer de Lavado Concentrado

Revelador	B
------------------	----------

Revelador B

Control	-
----------------	----------

Control Negativo



Chagatest

ELISA recombinante v.3.0

Ensaio imunoenzimático (ELISA) de 3ª geração para a detecção de anticorpos contra o *Trypanosoma cruzi*

SIGNIFICADO CLÍNICO

A enfermidade de Chagas, é uma infecção parasitária produzida pelo *Trypanosoma cruzi*.

O diagnóstico de laboratório depende do estágio no qual se encontra a enfermidade. Durante a fase aguda, o diagnóstico se efetua diretamente mediante a comprovação dos parasitas no sangue ou por métodos imunológicos que detectem IgM. Durante a fase crônica, podem ser utilizados os métodos imunológicos como a reação de fixação de complemento de Machado e Guerreiro, ou aglutinação de látex, floculação, hemaglutinação, aglutinação direta, imunofluorescência e ultimamente, ELISA.

FUNDAMENTOS DO MÉTODO

Nesta técnica qualitativa para a detecção de anticorpos anti-T. cruzi, a amostra é diluída num suporte onde se encontram imobilizados antígenos recombinantes (1, 2, 13, 30, 36 e SAPA), provenientes de proteínas específicas das formas tripomastigota e epimastigota, constituindo-se em um método de 3ª geração. Estes antígenos são obtidos pela técnica de ADN recombinante partindo de proteínas específicas dos estágios epimastigota e tripomastigota do T. cruzi, correspondentes a zonas altamente conservadas entre diferentes cepas. A tecnologia empregada permite assegurar uma mistura antigênica de composição conhecida e constante lote a lote, oferecendo resultados reproduzíveis, específicos e com alta sensibilidade. Se as amostras de soro contêm os anticorpos específicos, estes formarão um complexo com os antígenos e permanecerão unidos ao suporte. A fração não ligada é eliminada por lavagem e após se acrescentam anticorpos anti-imunoglobulina humana conjugados com peroxidase. No caso de ocorrer a reação na primeira etapa do processo, o conjugado então se ligará. Após uma nova lavagem se acrescenta o substrato enzimático. A peroxidase presente no conjugado reagirá com o substrato promovendo o desenvolvimento de coloração azul. A reação é interrompida com ácido sulfúrico, que muda a coloração do azul para o amarelo.

REAGENTES FORNECIDOS

Policubeta sensibilizada: policubeta de tiras removíveis com cubetas que contêm antígenos recombinantes de *Trypanosoma cruzi* imobilizados.

Conjugado: anti-imunoglobulinas humanas (cabra) conjugados com peroxidase.

Revelador A: peróxido de hidrogênio 60 mmol/l em tampão citrato 50 mmol/l pH 3,2.

Revelador B: tetrametilbenzidina (TMB) 0,01 mol/l em ácido clorídrico 0,1 N.

Stopper: ácido sulfúrico 2 N.

Tampão de Lavagem concentrado: cloreto de sódio 1,4 mol/l em tampão fosfatos 100 mmol/l e tensoativo não iônico 0,1 g/l.

Diluyente de Amostras: albumina bovina em solução fisiológica tamponada com tampão fosfatos pH 7,2.

Controle Positivo: diluição de soro inativado contendo anti-corpos contra o *Trypanosoma cruzi*.

Controle Negativo: diluição de soro não reativo, inativado.

INSTRUÇÕES PARA USO

Tampão de Lavagem: diluir 1+4 com água destilada (1 parte de Tampão de Lavagem concentrado + 4 partes de água destilada). A baixa temperatura os componentes do reagente podem precipitar. Neste caso, colocar em banho-maria a 37°C alguns minutos, misturando após por inversão.

Policubeta sensibilizada: pronta para uso.

Conjugado: pronto para uso.

Revelador A: pronto para uso.

Revelador B: pronto para uso.

Stopper: pronto para uso.

Diluyente de Amostras: pronto para uso. A cor do Diluyente de Amostras pode variar lote a lote sem que isto afete a capacidade reacional do mesmo.

Controle Positivo e Controle Negativo: prontos para uso.

PRECAUÇÕES

- Todas as amostras de pacientes devem ser manipuladas como se fossem capazes de transmitir infecção. Os controles encontram-se inativados. No entanto, devem ser usados como se tratando de material infectante.
- Os soros controles foram examinados para antígenos de superfície da hepatite B (HBsAg), vírus da imunodeficiência humana (HIV) e da hepatite C, encontrando-se não reativos.
- Todos os materiais empregados no ensaio devem ser destruídos a fim de assegurar a inativação dos agentes patogênicos. O método recomendado para este procedimento é autoclavar durante 1 hora a 121°C. Os líquidos de dejetos podem ser desinfetados com hipoclorito de sódio (concentração final 5%) durante no mínimo 60 minutos.
- Não misturar reagentes de diferentes kits e lotes.
- Não usar reagentes de outra origem.
- As policubetas devem ser incubadas em estufa. Não usar banho-maria. Deve-se evitar abrir a estufa durante este processo.
- Evitar que vapores de hipoclorito provenientes dos recipientes para dejetos biológicos entrem em contato com a policubeta, já que o hipoclorito afeta a reação.

- Os reagentes são para uso diagnóstico "in vitro".
- Evitar o contato do ácido sulfúrico com a pele ou mucosas. H315+H320: Provoca irritação cutânea e ocular. H314: Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves. P262: Não pode entrar em contacto com os olhos, a pele ou a roupa. P305 + P351 + P338: SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar. P302 + P352: SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar com sabonete e água abundantes. P280: Usar luvas de protecção/ vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.
- Evitar derramar os líquidos e a formação de aerossóis.

ESTABILIDADE E INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Reagentes Fornecidos: são estáveis sob refrigerador (2-10°C) até a data de vencimento indicada na embalagem. Não congelar.

Tampão de Lavagem: é estável 3 meses a temperatura ambiente.

Policubeta sensibilizada: as tiras de cubetas com antígeno imobilizado são fornecidas fechadas no vácuo e com dessecante. Não abrir o envoltório até o momento de uso, nem antes que esteja a temperatura ambiente, pois ao contrário se favorecerá a humectação do conteúdo. As tiras de cubetas não utilizadas devem ser conservadas na embalagem com o dessecante, fechado e a 2-10°C. As tiras conservadas nestas condições podem ser utilizadas nos 5 meses posteriores desde que não se ultrapasse a data de vencimento do kit.

AMOSTRA

Soro ou plasma

a) Coleta: obter soro da maneira usual. Não devem ser usadas amostras inativadas pelo calor. Vide LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO.

b) Aditivos: não são necessários para soro. Ao empregar plasma poderá ser utilizado qualquer anticoagulante de uso corrente na prática transfusional.

c) Substâncias interferentes conhecidas: a hemólise, hiperlipemia e outras causas de turbidez podem ser causa de resultados errôneos. Estas amostras devem ser clarificadas por centrifugação.

d) Estabilidade e instruções de armazenamento: as amostras não diluídas podem ser conservadas durante 7 dias entre 2-10°C. Para conservação por períodos mais prolongados devem ser congelados a -20°C ou temperaturas menores. Evitar os congelamentos e descongelamentos reiterados. Existem evidências que mostram que os congelamentos sucessivos podem ser causa de resultados errôneos. Se as amostras precisam ser transportadas, embalar de acordo com as especificações legais relativas ao envio de materiais infecciosos.

MATERIAL NECESSÁRIO (não fornecido)

- Micropipetas para medir os volumes indicados.
- Relógio alarme ou cronômetro.
- Estufa a 37°C.

- Espectrofotômetro para leitura de policubetas.
- Lavadora de policubetas.

CONDIÇÕES DE REAÇÃO

- Comprimento de onda primária: 450 nm
- Comprimento de onda secundária (bicromática): 620 nm
- Calibração do instrumento: levar a zero o espectrofotômetro com Branco de Reagente, processado da mesma forma que uma determinação, mas omitindo a colocação da amostra.
- Tempo de reação: variável conforme o procedimento selecionado.
- Temperatura de reação: 37 ± 2°C e temperatura ambiente (18-25°C).
- Volume de amostra: 10 ul

PROCEDIMENTO

I- TÉCNICA COM REVELADORES SEPARADOS

Levar os reagentes e amostras a temperatura ambiente antes de iniciar a prova. Uma vez iniciada a análise deve ser completada sem interrupção.

Processar simultaneamente 2 Controles Positivos (CP), 3 Negativos (CN) e os Desconhecidos (D). Ao dispensar as amostras e/ou Controles sobre o Diluente de Amostras, deve assegurar-se de colocar os mesmos no centro do líquido e não sobre as paredes ou o fundo da cubeta. Enxaguar a pipeta com o Diluente dispensado na cubeta, para assegurar a correta homogeneização.

Nas cubetas a utilizar da policubeta colocar:

	D	CP	CN
Diluente de Amostras	200 ul	200 ul	200 ul
Controle Positivo	-	10 ul	-
Controle Negativo	-	-	10 ul
Amostra	10 ul	-	-

Misturar aplicando batidas suaves nas laterais da policubeta durante 10 segundos após pipetadas as amostras em cada tira. No procedimento manual, para evitar a evaporação, cobrir a placa e incubar em estufa 30 ± 2 minutos a 37 ± 2°C. Após, aspirar cuidadosamente o líquido de cada cubeta desprezando-o em um recipiente para dejetos biológicos que contenha hipoclorito de sódio a 5%. Na continuação, lavar 5 vezes com Tampão de Lavagem (preparado conforme as instruções de uso da página. 1) em pregando aproximadamente 300 ul/vez/cubeta. Após cada lavagem o líquido deve ser descartado no recipiente com hipoclorito. Empregar lavador automático. Ao finalizar a última lavagem, eliminar completamente o líquido residual, invertendo a policubeta e batendo-a várias vezes sobre papel absorvente, exercendo uma leve pressão com a mão nas laterais maiores do suporte, para evitar a caída das tiras de cubetas. Após adicionar em cada cubeta:

Conjugado	50 ul	50 ul	50 ul
------------------	-------	-------	-------

Pode-se colocar 1 gota, utilizando o frasco gotejador fornecido.

Misturar aplicando batidas suaves nas laterais da policubeta durante 10 segundos. No procedimento manual, para evitar a evaporação, cobrir a placa e incubar durante 30 ± 2 minutos em estufa a $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Após, aspirar o líquido das cubetas, desprezando-o no recipiente com hipoclorito e lavar conforme se indicou anteriormente. Ao finalizar a última lavagem, eliminar completamente o líquido residual, invertendo a policubeta e batendo-a várias vezes sobre papel absorvente, exercendo uma leve pressão com a mão sobre as laterais maiores do suporte, para evitar a caída das tiras de cubetas. Após adicionar em cada cubeta respeitando a ordem dos reagentes:

Revelador A	50 ul	50 ul	50 ul
Revelador B	50 ul	50 ul	50 ul

Pode-se colocar 1 gota de cada Revelador, utilizando o frasco gotejador fornecido.

Misturar aplicando batidas suaves nas laterais da policubeta durante 10 segundos. Incubar 30 ± 2 minutos a temperatura ambiente ($18-25^\circ\text{C}$), após adicionar:

Stopper	50 ul	50 ul	50 ul
----------------	-------	-------	-------

Pode-se colocar 1 gota, utilizando o frasco gotejador fornecido.

Misturar aplicando batidas suaves nas laterais da policubeta durante 10 segundos. Ler em espectrofotômetro a 450 nm ou efetuar leitura bicromática a 450/620 nm.

II- TÉCNICA COM REVELADORES PRE-MISTURADOS

Levar os reagentes e amostras a temperatura ambiente antes de iniciar a prova. Uma vez iniciada a análise deve ser completada sem interrupção.

Processar simultaneamente 2 Controles Positivos (CP), 3 Negativos (CN) e os Desconhecidos (D). Ao dispensar as amostras e/ou Controles sobre o Diluente de Amostras, deve assegurar-se de colocar os mesmos no centro do líquido e não sobre as paredes ou o fundo da cubeta. Enxaguar a pipeta com o Diluente dispensado na cubeta, para assegurar a correta homogeneização.

Nas cubetas a utilizar da policubeta colocar:

	D	CP	CN
Diluente de Amostras	200 ul	200 ul	200 ul
Controle Positivo	-	10 ul	-
Controle Negativo	-	-	10 ul
Amostra	10 ul	-	-

Misturar aplicando batidas suaves nas laterais da policubeta durante 10 segundos após pipetadas as amostras em cada tira. No procedimento manual, para evitar a evaporação, cobrir a placa e incubar em estufa $30-35$ minutos a $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Após, aspirar cuidadosamente o líquido de cada cubeta desprezando-o em um recipiente para dejetos biológicos que contenha hipoclorito de sódio a 5%. Na continuação, lavar 5 vezes com Tampão de Lavagem (preparado conforme instruções de uso da página. 1) empregando aproximadamente 300 ul/vez/cubeta.

Após cada lavagem o líquido deve ser descartado no recipiente com hipoclorito. Empregar lavador automático. Ao finalizar a última lavagem, eliminar completamente o líquido residual, invertendo a policubeta e batendo-a várias vezes sobre papel absorvente, exercendo uma leve pressão com a mão sobre as laterais maiores do suporte, para evitar a caída das tiras de cubetas. Após adicionar em cada cubeta:

Conjugado	50 ul	50 ul	50 ul
------------------	-------	-------	-------

Pode-se colocar 1 gota, utilizando o frasco gotejador fornecido. Misturar aplicando batidas suaves nas laterais da policubeta durante 10 segundos. No procedimento manual, para evitar a evaporação, cobrir a placa e incubar durante 20-25 minutos em estufa a $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Após, aspirar o líquido das cubetas, desprezando-o no recipiente com hipoclorito e lavar conforme se indicou anteriormente. Ao finalizar a última lavagem, eliminar completamente o líquido residual, invertendo a policubeta e batendo-a várias vezes sobre papel absorvente, exercendo uma leve pressão com a mão sobre as laterais maiores do suporte, para evitar a caída das tiras de cubetas. Após adicionar uma mistura de partes iguais de Revelador A + Revelador B (estável 24 horas):

Reveladores misturados	100 ul	100 ul	100 ul
-------------------------------	--------	--------	--------

Misturar aplicando batidas suaves nas laterais da policubeta durante 10 segundos. Incubar 20-25 minutos a temperatura ambiente ($18-25^\circ\text{C}$), após adicionar:

Stopper	50 ul	50 ul	50 ul
----------------	-------	-------	-------

Pode-se colocar 1 gota, utilizando o frasco gotejador fornecido. Misturar aplicando batidas suaves nas laterais da policubeta durante 10 segundos. Ler em espectrofotômetro a 450 nm ou efetuar leitura bicromática a 450/620 nm.

ESTABILIDADE DA MISTURA FINAL DE REAÇÃO

A cor da reação é estável durante 30 minutos, portanto os resultados devem ser observados durante este período.

CRITÉRIOS DE VALIDAÇÃO DA PROVA

A prova é considerada válida se cumpridas simultaneamente as seguintes condições:

- As leituras de pelo menos 2 dos 3 Controles Negativos corrigidas contra o Branco de Reagente devem ser menores ou iguais a 0,150 D.O.
- A leitura média dos Controles Positivos corrigida deve ser maior ou igual a 0,600 D.O.

Se uma ou ambas as condições não se cumprirem, repetir a prova. Para ambos os casos lembrar que as leituras obtidas dependerão da sensibilidade do aparelho empregado.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A presença ou ausência de anticorpos anti-T. cruzi é determinada relacionando a absorbância da amostra com o valor do Cut-off.

Cut-off = CNx + 0,300 D.O.

onde CNx: média das leituras do Controle Negativo. Zona de indeterminação: Cut-off $\pm$ 10%

Amostras Não Reativas: são consideradas aquelas com absorbâncias menores que o limite inferior da zona de indeterminação.

Amostras Reativas: são consideradas aquelas com absorbâncias maiores que o limite superior da zona de indeterminação.

Amostras Indeterminadas: são consideradas aquelas com absorbâncias que caem dentro da zona de indeterminação. Estas amostras devem ser ensaiadas novamente.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Vide Substâncias interferentes conhecidas em AMOSTRA.

- Constituem causas de resultados errôneos:

Lavagem incorreta das cubetas de reação.

Contaminação cruzada de amostras Não Reativas com an-ticorpos procedentes de uma amostra Reativa.

Contaminação da solução cromogénica com agentes oxidantes (cloro, etc.).

Contaminação do Stopper.

Conservação inadequada das tiras de cubetas não utilizadas. Utilizar banho-maria para a incubação.

Contaminação do Tampão de Lavagem diluído: recomenda-se conferir a limpeza dos frascos onde é preparado e armazenado. Se for observada turbidez ou precipitação na preparação, despreza-lo.

- Um resultado negativo não exclui a possibilidade de exposição ou infecção por T. cruzi.

- Ocasionalmente, ao realizar leituras bicromáticas, podem obter-se absorbâncias negativas que não interferem na determinação, isto porque algumas amostras podem resultar com leituras abaixo do Branco de Reagente.

- Dependendo da sensibilidade do espectrofotômetro usado, são encontradas amostras que podem ter valores acima da faixa numérica de leitura. Estes resultados devem-se interpretar como reativos. Nestes casos particulares, para obter valores numéricos, pode-se realizar a leitura a 490 nm ou 490/650 nm.

- Não devem ser utilizadas amostras inativadas pelo calor já que podem ocasionar resultados falsos positivos.

- Certifique-se que o sistema de lavagem que está sendo usado aspire totalmente o conteúdo e que o volume da solução de lavagem dispensada seja regular.

PERFORMANCE

Não se observa diferença significativa nos resultados obtidos na performance, utilizando os dois procedimentos anteriores.

a) Sensibilidade: num painel de 70 amostras com xeno-diagnóstico e sorologia positivos a sensibilidade estima-se em 100%. Em outro painel de 144 amostras com sorologia positiva com métodos de hemaglutinação indireta, imunofluorescência indireta e outros ELISA, a sensibilidade estima-se em 99,3%. IC 95%: 98,92% - 100,00%

b) Especificidade: num painel de 75 amostras com xeno-diagnóstico e sorologia negativos, a especificidade estima-se em 98,7%.

Em outro painel de 200 amostras com sorologia negativa por métodos de hemaglutinação indireta, imunofluorescência indireta e outros ELISA, a especificidade estima-se em 100%. IC 95%: 89,61% - 100,00%

c) Estudo populacional: em uma população geral que inclui indivíduos saudáveis, doadores, chagásicos e com outras patologias, a correlação em relação a métodos confirmatórios foi de 99,6%.

A sensibilidade do método (seus resultados) ao igual que os de qualquer método sorológico, só constituem mais um dado auxiliar em termos de probabilidade. Por essa razão os informes devem ser considerados prováveis. Neste caso, maior ou menor probabilidade de parasitose por T. cruzi.

Qualquer resultado Reativo, deve ser conferido por outra técnica.

PARÂMETROS PARA ANALISADORES AUTOMÁTICOS

Vide as adaptações específicas para cada tipo de analisador, que deverão ser solicitadas ao setor Atendimento ao Cliente Wiener lab/Labinbraz.

APRESENTAÇÃO

Kit para 96 determinações (Cód. 1293254).

REFERÊNCIA

- Frasc, 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.; Frasc, 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).

- Knecher, L.M.; Capriotti, G.A.; Rojkin, L.F.; Lorenzo, L.E. - Rev. Asoc. Bioq. Arg. 58/3:125, 1994.

- Capriotti, G.A.; Felcaro, M.V.; Toplikar, E.M.; Gariglio, R.C. - 52º Annual Meeting AACC, San Francisco, CA - Clin. Chem. 46/S6:A51, Abs 190A, 2000.

EXPLICAÇÃO DOS SÍMBOLOS

Policubeta	Sensib.
------------	---------

Policubeta sensibilizada

Conjugado

Conjugado

Revelador A

Revelador A

Control	+
---------	---

Controle Positivo

Stopper

Stopper

Diluyente	Muestra
-----------	---------

Diluyente de Amostra

Buf. Lavado	Conc.
-------------	-------

Tampão de Lavagem Concentrado

Revelador B

Revelador B

Control	-
---------	---

Controle Negativo



Chagatest

ELISA recombinante v.3.0

3rd Generation method for the detection of antibodies
to *Trypanosoma cruzi*

SUMMARY

Chagas' disease is a parasitic infection caused by the *Trypanosoma cruzi*.

The laboratory diagnosis depends on the stage of the disease. During the acute phase, the diagnosis is directly done by detecting the parasite in blood or through immunological methods that detect IgM. During the chronic phase, immunological methods can be used, such as the Machado and Guerreiro complement fixation reaction or latex agglutination, flocculation, hemagglutination, direct agglutination, immunofluorescence and lately ELISA.

PRINCIPLE

In this qualitative technique for the detection of antibodies anti-*T. cruzi*, the sample is diluted in the support in which the recombinant antigen (1, 2, 13, 30, 36 and SAPA) is immobilized (3rd generation method). These antigens are obtained by DNA recombinant techniques starting from specific proteins from the epimastigote and trypomastigote stages of the *T. cruzi* corresponding to highly conserved zones among different strains. The technology used allows us to ensure an antigenic mixture of known and permanent composition batch to batch, giving reproducible, specific and highly sensitive results. If the sample contains specific antibodies, these will form a complex with the antigens and will remain bound to the support. The unbound fraction is eliminated by washing, after which anti-human immunoglobulin antibodies conjugated to peroxidase are added. If a reaction was produced in the first step of the process, the conjugate will be bound. After a new wash the enzymatic substrate is added. If bound conjugate is present, a light blue color will be developed. The reaction is stopped by adding sulfuric acid, and the color change to yellow.

PROVIDED REAGENTS

Coated microtitration plate: microtitration plate with removable strips containing immobilized *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens.

Conjugate: goat anti-human immunoglobulins conjugated to peroxidase.

Substrate A: 60 mmol/l hydrogen peroxide in 50 mmol/l citrate buffer, pH 3.2.

Substrate B: 0.01 mol/l tetramethylbenzidine (TMB) in 0.1 N hydrochloric acid.

Stopper: 2 N sulfuric acid.

Concentrated Wash Buffer: 1.4 mol/l sodium chloride in 100 mmol/l phosphate buffer and 0.1 g/l non-ionic surfactant.

Sample Diluent: bovine albumin in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2.

Positive Control: dilution of inactivated serum containing antibodies against *Trypanosoma cruzi*.

Negative Control: dilution of inactivated non-reactive serum.

INSTRUCTIONS FOR USE

Wash Buffer: to use dilute 1+ 4 with distilled water (1 part Wash Buffer + 4 parts distilled water).

Constituents of this reagent may precipitate at low temperature. In such case, place in water bath at 37°C for a few minutes and mix by inversion.

Coated microtitration plate, Conjugate, Substrate A, Substrate B and Stopper: ready to use.

Sample Diluent: ready to use. The Sample Diluent color may vary from batch to batch without affecting the performance.

Negative and Positive Controls: ready to use.

WARNINGS

- All samples should be handled as capable of transmitting infection. Controls are inactivated, however, they should be handled as infectious material.

- The control sera have been examined for Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg), Human Immunodeficiency Virus (HIV) and Hepatitis C virus and have been found non-reactive.

- All the materials used to perform the test must be destroyed to ensure the inactivation of pathogenic agents. The recommended method is autoclaving one hour at 121°C. Liquid waste can be disinfected with sodium hypochlorite (5% final concentration) for at least 60 minutes.

- Do not exchange reagents from different kits and batches.

- Do not use foreign reagents.

- The microtitration plates should be incubated in incubator. Do not use water bath. Do not open the incubator during this process.

- Avoid the contact of strips with hypochlorite fumes, from biohazardous disposal containers or other sources, because hypochlorite affects the reaction.

- Reagents are for "in vitro" diagnostic use.

- Sulfuric acid is corrosive. H315+H320: Causes skin and eye irritation. H314: Causes severe skin burns and eye damage.

P262: Do not get in eyes, on skin, or on clothing. P305 + P351 + P338: IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. P302 + P352: IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water. P280: Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

- Avoid the spill of liquids and the formation of sprays.

STABILITY AND STORAGE INSTRUCTIONS

Provided Reagents are stable in refrigerator (2-10°C) until the

expiration date shown on the box. Do not freeze.

Wash Buffer: stable for 3 months at room temperature.

Coated microtitration plate: well strips with immobilized antigen are provided in vacuum-sealed pouches with desiccant. Do not open the pouch until performing the test and it has reached room temperature, otherwise the contents can get moistened. Unused well strips should be kept in the pouch with the desiccant, sealed and stored at 2-10°C. Under these conditions, the strips can be used within 5 months, as long as the expiration date of the kit has not elapsed.

SAMPLE

Serum or plasma

a) Collection: obtain in usual way. Do not use samples inactivated by heat. See PROCEDURE LIMITATIONS.

b) Additives: not required for serum. When using plasma, any anticoagulant commonly used for transfusions can be employed.

c) Known interfering substances: hemolysis, hyperlipemia or other causes of turbidity may cause erroneous results. These samples must be clarified by centrifugation.

d) Stability and storage instructions: undiluted samples can be stored at 2-10°C for 7 days. For longer storage periods samples should be frozen at -20°C or lower. Avoid repeated freezing and thawing. Samples should not be refrozen, since it may cause erroneous results.

If samples are to be transported, they should be packed according to local regulations for biohazardous materials shipment.

REQUIRED MATERIAL (non-provided)

- Micropipettes for measuring the stated volumes.
- Timer or stopwatch.
- Incubator at 37°C.
- Spectrophotometer for microtitration plates reading (optional).

ASSAY CONDITIONS

- Primary wavelength: 450 nm
- Secondary wavelength (bichromatic): 620-650 nm
- Instrument calibration: bring the spectrophotometer to zero with Reagents Blank, processing it as a test but omitting addition of the Sample.
- Total reaction time: 90 minutes
- Reaction temperature: 37°C and room temperature
- Sample volume: 10 µl

PROCEDURE

Bring the reagents and the samples to room temperature before use. Once the test has begun, it should be completed without interruption.

Simultaneously process 2 Positive Controls (PC), 3 Negative Controls (NC) and the unknown (U). When placing the sample and/or Controls on the Sample Diluent, make sure to put them on the center of the liquid and not on the walls or bottom of the well. Rinse the pipette with the Diluent

dispensed in the well to ensure a correct homogenization. In the microtitration plate to be used, place:

	U	PC	NC
Sample Diluent	200 µl	200 µl	200 µl
Positive Control	-	10 µl	-
Negative Control	-	-	10 µl
Sample	10 µl	-	-

Once the samples have been dispensed on each strip, mix by gently tapping the sides of the microtitration plate for 10 seconds. To avoid evaporation, cover the plate and incubate 30 minutes in incubator at 37°C. Then, carefully aspirate the fluid from each well into a biohazardous container with 5% sodium hypochlorite. Then, wash 5 times with Wash Buffer, using approximately 300 µl/time/well. After each wash, the liquid should be discarded into the container with hypochlorite. Optionally use automated washer. After the last wash, completely discard the residual liquid, inverting and tapping the microtitration plate several times onto absorbent paper, gently pressing with the hand the long sides to prevent the well strips from falling. Then, add to each well:

Conjugate	1 drop	1 drop	1 drop
------------------	--------	--------	--------

If using an automated micropipette, dispense 50 µl. Mix by gently tapping the sides of the microtitration plate for 10 seconds. To avoid evaporation, cover the plate and incubate 30 minutes in incubator at 37°C. Then, carefully aspirate the fluid from each well into the container with hypochlorite, and wash as indicated above. After the last wash, completely discard the residual liquid, inverting and tapping the microtitration plate several times onto absorbent paper, gently pressing with the hand the long sides to prevent the well strips from falling. Then, add to each well:

Substrate A	1 drop	1 drop	1 drop
Substrate B	1 drop	1 drop	1 drop

If using an automated micropipette, dispense 50 µl. Mix by gently tapping the sides of the microtitration plate for 10 seconds. Incubate 30 minutes at room temperature. Then add:

Stopper	1 drop	1 drop	1 drop
----------------	--------	--------	--------

If using an automated micropipette, dispense 50 µl. Mix by gently tapping the sides of the microtitration plate for 10 seconds. Read in spectrophotometer at 450 nm or bichromatic at 450/620-650 nm or evaluate the result with the naked eye by comparing it with Positive and Negative Controls.

STABILITY OF FINAL REACTION

Reaction color is stable for 30 minutes, therefore the results should be read within this period.

RUN VALIDATION CRITERIA

Run is valid if the following two conditions are met simultaneously:

a) The readings of at least 2 out of the 3 Negative Controls corrected against the Reagents Blank, should be equal or less than 0.150 O.D.

b) The corrected mean reading of Positive Controls should be equal or higher than 0.600 O.D.

If one or both of these conditions are not met, repeat the run. Remember that the obtained readings will depend on the sensitivity of the reader in use.

INTERPRETATION OF RESULTS

a) With optical instruments:

The presence or absence of antibodies to *T. cruzi* is determined by relating the sample absorbance with the Cut-off value.

Cut-off = NC + 0.300 O.D.

where NC: average of Negative Controls readings

Indetermination Area: Cut-off $\pm$ 10%

Non-Reactive Samples: samples with absorbances lower than the indetermination area lowest limit.

Reactive Samples: samples with absorbances higher than the indetermination area highest limit.

Indeterminate Samples: samples with absorbances falling within the indetermination area. These samples must be retested.

b) Visual interpretation:

If this kind of interpretation is chosen, all samples that do not show a stronger color than the Negative Controls, should be considered non-reactive. On the contrary, a yellow sample is considered reactive.

PROCEDURE LIMITATIONS

See Known interfering substances under SAMPLE.

- The following are causes of erroneous results:
 - Improper washing of wells.
 - Cross contamination of non-reactive samples with antibodies from a reactive sample.
 - Contamination of the chromogenic solution with oxidizing agents (chlorine, etc.).
 - Contamination of the Stopper.
 - Improper storage of unused strips wells.
 - Do not use water bath for the incubation.
 - Contamination of the diluted Wash Buffer. Verify that clean bottles are used to prepare and store the diluted Wash buffer. If turbidity or precipitation are observed when prepared, it should be discarded.
- A negative result does not exclude the possibility of exposure or infection by *T. cruzi*.
- Occasionally negative absorbances may be obtained when performing bichromatic readings that do not invalidate the determination. This is because some samples yield readings below the Reagent Blank.
- Samples that may yield values above the numeric reading range are found, depending on the sensitivity of the photometer used. These results should be interpreted as reactive. For these particular cases reading at 490 nm or 490/650 nm can be performed in order to obtain numeric values.

- Do not use heat inactivated samples, since they may yield false positive results.
- Check that the washing system in use (WIENER WASHER or other) aspirates properly, and that the wash solution is dispensed evenly.

PERFORMANCE

a) Sensitivity: over a panel of 70 samples with positive xenodiagnostic and serology, the sensitivity is 100%.

Over another panel of 144 samples with positive serology with indirect hemagglutination methods, indirect immunofluorescence and other ELISAs, the sensitivity is 99.3%.

b) Specificity: over a panel of 75 samples with negative xenodiagnostic and serology, the specificity is 98.7%. Over another panel of 200 samples with negative serology by indirect hemagglutination methods, indirect immunofluorescence and other ELISAs, the specificity is 100%.

c) Population-based studies: in a population including healthy individuals, donors, chagasic individuals and other pathologies, the correlation with other reference methods was 99.6%.

Despite the sensitivity of the method, its results, as well as those of any other serological method, constitute auxiliary data for the diagnosis. Therefore, the reports should be considered in terms of probability. In this case, more or less probability of *T. cruzi* parasitemia.

Any reactive result must be verified by other technique, such as immunofluorescence, complement fixation, indirect hemagglutination, direct hemagglutination, etc.

Verify any Reactive result using an additional technique. Mind the "Fátala Chaben" Institute recommendations, according to which the immunodiagnosis of the infection should be performed with a minimum of two of the following methods: indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination, ELISA, (latex) particles agglutination, validated by the Centro Nacional de Referencia.

WIENER LAB. PROVIDES

- Kit for 96 tests (Cat. N° 1293254).

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.; Carriarte, 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).
- Knecher, L.M.; Capriotti, G.A.; Rojkin, L.F.; Lorenzo, L.E. - Rev. Asoc. Bioq. Arg. 58/3:125, 1994.
- Ministerio de Salud y Acción Social, Instituto Nacional de Parasitología "Doctor Mario Fátala 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 AACCC, San Francisco, CA - Clin. Chem. 46/S6:A51, Abs 190A, 2000.

SYMBOLS EXPLANATION

Policubeta	Sensib.	Diluyente	Muestra
Coated microtitration plate		Sample Diluent	
Conjugado		Buf. Lavado	Conc
Conjugate		Concentrated Wash Buffer	
Revelador	A	Revelador	B
Substrate A		Substrate B	
Control	+	Control	-
Positive Control		Negative Control	
Stopper			
Stopper			

SIMBOLOS // SÍMBOLOS // SYMBOLS

Simbolos que podrían encontrarse en los kits de reactivos para diagnóstico de Wiener lab. // Símbolos que podem ser encontrados nos kits de reagentes para diagnóstico da Wiener lab. // Symbols that might be found on Wiener lab diagnostic reagent kits.

CE	Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro" // Este produto preenche os requisitos da Diretiva Europeia 98/79 CE para dispositivos médicos de diagnóstico "in vitro" // This product fulfills the requirements of the European Directive 98/79 EC for "in vitro" diagnostic medical devices
EC REP	Representante autorizado en la Comunidad Europea // Representante autorizado na Comunidade Europeia // Authorized representative in the European Community
IVD	Uso diagnóstico "in vitro" // Uso médico-diagnóstico "in vitro" // "In vitro" diagnostic medical device
	Contenido suficiente para <n> ensayos // Conteúdo suficiente para <n> testes // Contains sufficient for <n> tests
	Fecha de caducidad // Data de validade // Use by
	Límite de temperatura (conservar a) // Limite de temperatura (conservar a) // Temperature limitation (store at)
	No congelar // Não congelar // Do not freeze
	Riesgo biológico // Risco biológico // Biological risks
	Volumen después de la reconstitución // Volume após a reconstituição // Volume after reconstitution
Cont.	Contenido // Conteúdo // Contents
LOT	Número de lote // Número de lote // Batch code
	Elaborado por: // Elaborado por: // Manufactured by:
	Nocivo // Nocivo // Harmful
	Corrosivo // Corrosivo // Corrosive
	Irritante // Irritante // Irritant
	Peligroso para el medio ambiente acuático // Perigoso para o ambiente aquático // Hazardous to the aquatic environment
	Peligro por aspiración // Risco de aspiração // Aspiration hazard
	Consultar instrucciones de uso // Consultar as instruções de uso // Consult instructions for use
Calibr.	Calibrador // Calibrador // Calibrator
CONTROL	Control // Controle // Control
CONTROL +	Control Positivo // Controle Positivo // Positive Control
CONTROL -	Control Negativo // Controle Negativo // Negative Control
REF	Número de catálogo // Número de catálogo // Catalog number

IVD

Wiener Laboratorios S.A.I.C.
Riobamba 2944
2000 - Rosario - Argentina
<http://www.wiener-lab.com>
Dir. Téc.: Viviana E. Cétola
Bioquímica
Producto Autorizado A.N.M.A.T.
Cert. N°: 2872/98



Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina