

CHEMLIS® Chagas R-iELISA



Kit de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi* en muestras de suero humano.

*Indirect ELISA kit for the detection of anti *Trypanosoma cruzi* antibodies in human serum.*



Elisa



Humano

 Chemtest S.A.

Av. 25 de Mayo 1021, San Martín (C.P. 1650), Buenos Aires, Argentina.
info@chemtest.net - chemtest.net

CHEMLIS®
Chagas R-iELISA

Contenido

<i>Microplaca de análisis</i>	Microplacas de 96 pocillos recubiertas con los antígenos, selladas y almacenadas en seco	2 microplacas (192 determinaciones)
<i>Conjugado</i>	Liofilizado (anticuerpos anti-IgG humana conjugados con peroxidasa de rábano)	2 unidades
<i>Solución sustrato-cromógeno</i>	Lista para usar [3,3',5,5'-Tetrametilbencidina en solución de sustrato con peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)] – CONSERVAR EN OSCURIDAD	1 x 30 ml
<i>Solución de frenado</i>	Lista para usar (contiene ácido clorhídrico 1%) - CORROSIVO	1 x 30 ml
<i>Solución de lavado</i>	Concentrada 10X	1 x 120 ml, 10X (c. s. p. 1,2 litros)
<i>Diluyente de muestra</i>	Para reconstituir - CONTIENE CONSERVANTE [Timerosal (C ₉ H ₉ HgNaO ₂ S) 0,01%]	2 x 120 ml
<i>Control positivo</i>	Suero - CONTIENE CONSERVANTE [Timerosal (C ₉ H ₉ HgNaO ₂ S) 0,01%]	1 x 0,08 ml
<i>Control negativo</i>	Suero - CONTIENE CONSERVANTE [Timerosal (C ₉ H ₉ HgNaO ₂ S) 0,01%]	1 x 0,08 ml
<i>Manual de instrucciones</i>		1

Nombre y aplicación

CHEMLIS® Chagas R-iELISA

Kit de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi* en muestras de suero humano.

El kit CHEMLIS® Chagas R-iELISA es un kit de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) indirecto para la detección de anticuerpos IgG específicos contra *Trypanosoma cruzi*, agente causante de la enfermedad de Chagas, en muestras de suero humano. Gracias a su exclusiva combinación de cuatro antígenos recombinantes, el kit posee un excelente desempeño diagnóstico. CHEMLIS® Chagas R-iELISA puede usarse como test de screening y/o confirmatorio.

Introducción

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas constituye un importante problema de salud y económico en América Latina. Esta enfermedad es causada por el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi*. Este parásito se encuentra en todo el continente americano en una variedad de reservorios mamíferos silvestres y domésticos, y se transmite por la picadura de insectos hematófagos triatomíneos infectados. Además de la transmisión vectorial, los humanos pueden infectarse con *T. cruzi* por ingestión de alimentos y líquidos contaminados, de madre a hijo durante el embarazo y mediante transfusión de sangre contaminada o trasplante de órganos. Actualmente, se estima que hay entre 10 y 12 millones de personas infectadas y 120 millones de personas que viven en áreas endémicas están en riesgo de infección y, por lo tanto, en riesgo de desarrollar patología cardíaca o intestinal normalmente asociada con la enfermedad de Chagas crónica. El aumento de los viajes y la inmigración también ha llevado el riesgo de infección por *T. cruzi* a paí-

ses no endémicos como España, Australia y los Estados Unidos, donde ya se han notificado algunos casos autóctonos de transmisión.

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas constituye un desafío importante para los médicos porque a menudo es asintomática durante la fase aguda y evoluciona a una etapa crónica que tiene diferentes formas clínicas. Además, y debido a una disminución importante en la parasitemia durante la fase crónica de la enfermedad, la detección de *T. cruzi* en muestras de sangre por examen directo, hemocultivo o xenodiagnóstico es difícil, laborioso y lento. Por lo tanto, la detección de anticuerpos anti *T. cruzi* (típicamente en muestras de sangre) sigue siendo el método más eficaz para demostrar la exposición directa al parásito. En la actualidad, los métodos serológicos más utilizados son el ensayo de hemaglutinación indirecta (IHA), la inmunofluorescencia indirecta (IIF) y el ELISA utilizando homogeneizados de parásitos totales o fracciones antigénicas semi-purificadas. A pesar de su simplicidad y bajo costo, estas pruebas muestran variaciones en su reproducibilidad y confiabilidad que pueden atribuirse a la pobre estandarización en la preparación de los antígenos. Las tecnologías del ADN recombinante y la síntesis de péptidos permite la producción y la purificación en un solo paso de grandes cantidades de antígenos inmunodominantes de *T. cruzi*. Una ventaja adicional de los antígenos recombinantes y los péptidos sintéticos es que minimizan los problemas de especificidad, uno de los principales inconvenientes del inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas.

Principio de la técnica

El kit CHEMLIS® Chagas R-iELISA es un ensayo inmunoenzimático indirecto en fase sólida basado en la detección de IgG contra *Trypanosoma cruzi*. En este ensayo los anticuerpos presentes en la muestra de suero reaccionan con los

antígenos recombinantes (combinación exclusiva de cuatro proteínas recombinantes) que recubren los pocillos. Si la muestra contiene anticuerpos contra estas proteínas de *Trypanosoma cruzi*, estos se unen al pocillo. Al añadir los anticuerpos anti-IgG humana conjugados a peroxidasa de rábano (HRP), se forma un complejo con los anticuerpos IgG unidos al pocillo. El material libre es eliminado mediante lavados antes de agregar la solución sustrato-cromógeno. El color azul que aparece es el producto de la reacción del sustrato-cromógeno con el conjugado y la intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra que reaccionan con los antígenos. Cuanto mayor es el título de anticuerpos presentes en la muestra, más intenso es el desarrollo de color en los pocillos de ensayo. La reacción se detiene mediante el agregado de la solución de frenado y se observa un cambio de color al amarillo. La lectura de los resultados se realiza en un espectrofotómetro de microplacas midiendo la absorbancia (Abs) a 450 nm.

Componentes del kit

-Microplaca de análisis

Microplacas de 96 pocillos (12 strips x pocillos) recubiertas con los antígenos, selladas y almacenadas en seco.

-Solución de lavado

Concentrada 10X.

-Conjugado

Liofilizado (anticuerpos anti-IgG humana conjugados con peroxidasa de rábano).

-Solución sustrato-cromógeno

Lista para usar [3,3',5,5'-Tetrametilbencidina en solución de sustrato con peróxido de hidrógeno (H_2O_2)] - CONSERVAR EN OSCURIDAD.

-Solución de frenado

Lista para usar (contiene ácido clorhídrico 1%) - CORROSIVO.

-Diluyente de muestra

Para reconstituir - CONTIENE CONSERVANTE [Timmerosal ($C_9H_9HgNaO_2S$) 0,01%].

-Control positivo

Suero - CONTIENE CONSERVANTE [Timmerosal ($C_9H_9HgNaO_2S$) 0,01%].

-Control negativo

Suero - CONTIENE CONSERVANTE [Timmerosal ($C_9H_9HgNaO_2S$) 0,01%].

-Manual de instrucciones

Almacenamiento y vencimiento

Conservar a temperatura entre 2 y 8°C. Temperatura de transporte: 4 a 15°C hasta 72 horas. La conservación correcta de todos los componentes del kit permitirá el uso del mismo hasta la fecha de caducidad.

Vencimiento: 12 meses. No utilizar componentes de diferentes lotes o después de la fecha de vencimiento.

Materiales necesarios que no se suministran

-Pipeta multicanal y micropipetas (10, 100 y 1000 μ l) de alta precisión.

-Contenedores para pipeta multicanal.

-Puntas de pipetas desechables.

-Lector de microplacas capaz de medir la absorbancia (Abs) a 450 nm.

-Agitador orbital.

-Cronómetro.

-Tubos para la dilución de los controles y muestras.

-Recipiente de 1 litro para preparación de solución de lavado.

-Agua destilada (Tipo II) o ultrapura (Tipo I).

-Cobertor para microplacas (tapa, papel aluminio o film adhesivo).

Precauciones de uso

1. Leer atentamente y seguir todas las instrucciones de uso ajustándose estrictamente al procedimiento detallado en el manual de instrucciones incluido en el kit.

2. Conservar el kit y todos sus componentes a 2-8°C.

3. Antes de usar dejar que todos los componentes del kit alcancen la temperatura ambiente (20-25°C), y colocar nuevamente a 2-8°C después de su uso.

4. Manipular todos los reactivos siguiendo la Buenas Prácticas de Laboratorio.
5. Las muestras de suero, como así también los controles positivo y negativo, deben considerarse potencialmente infecciosas y, por lo tanto, estas y los componentes del kit que las contactan deben manipularse con guantes y descartarse como residuo patológico según normativa legal vigente. La Solución de frenado contiene ácido clorhídrico (corrosivo). Su contacto con la piel genera irritación y debe manipularse con guantes. El resto de los componentes del kit no representan ningún riesgo potencial para la salud y el medio ambiente.
6. No usar el kit pasada la fecha de caducidad o si los componentes no fueron conservados en las condiciones indicadas arriba.
7. No mezclar componentes o manuales de instrucciones de kits de distintos lotes.
8. Manipule los componentes del kit con cuidado para evitar la contaminación de los mismos.
9. Si se reutilizan los contenedores para pipeta multicanal, los mismos deben ser lavados de forma exhaustiva con agua de alta calidad e identificados para ser reutilizados con la misma solución.
10. Usar puntas de pipetas distintas para cada reactivo y para cada muestra.
11. Incluir los controles positivo y negativo, y el blanco de muestra al menos por duplicado en cada serie de análisis.
12. Para la reconstitución de los reactivos usar solamente agua destilada (Tipo II) o ultrapura (Tipo I).

Preparación de reactivos para una microplaca de análisis (96 reacciones)

a. Solución de lavado 1X

Llevar la Solución de lavado concentrada 10X a temperatura ambiente (20- 25°C) y agitar muy bien para garantizar la completa disolución de posibles precipitados.

La Solución de lavado concentrada 10X

debe diluirse 1/10 con agua destilada (Tipo II) o ultrapura (Tipo I); por ejemplo, agregando 40 ml de Solución de lavado 10X a 360 ml de agua (cantidad suficiente de Solución de lavado 1X para procesar una microplaca: 10 ml para reconstituir el conjugado IgG, 120 ml para reconstituir el Diluyente de muestra y el resto para los lavados). Mezclar muy bien antes de usar. Una vez preparada, la Solución de lavado 1X se puede conservar a 2-8°C durante 7 días.

b. Conjugado

Reconstituir el conjugado liofilizado añadiendo 10 ml (por frasco) de la Solución de lavado 1X preparada previamente (ver ítem anterior). Añadir la solución de lavado cuidadosamente. Dejar reposar el frasco un minuto y mezclar muy bien. Preparar inmediatamente antes de usar.

Para una mayor exactitud, se recomienda pipetear los 10 ml utilizando dos marcas de calibración de la pipeta (por ejemplo: pipeteando dos veces de cero a 5 ml, o una vez de la posición -1 a 9 de la pipeta).

La solución de conjugado sobrante se puede alícuotar en tubos tipo eppendorf y conservar a -20°C (no se puede conservar en el refrigerador) durante un tiempo máximo de 30 días. En este período de tiempo cada alícuota se puede congelar y descongelar una sola vez.

c. Diluyente de muestra

Reconstituir el Diluyente de muestra agregando la Solución de lavado 1X preparada previamente hasta el nivel indicado en el frasco correspondiente y mezclar muy bien hasta lograr una completa disolución. Preparar inmediatamente antes de usar.

El Diluyente de muestra remanente se puede conservar en el refrigerador (2 a 8°C) hasta 3 meses o a -20°C durante un año. Antes de usar, descongelar totalmente, llevar a temperatura ambiente y mezclar muy bien hasta completa diso-

lución.

Preparación de los controles para una microplaca de análisis (96 reacciones)

a. Control positivo (CP) y control negativo (CN)

En tubos de 1,5 ml agregar 4 µl de cada control a 800 µl de Diluyente de muestra (dilución 1:200). Mezclar bien antes de usar. En cada microplaca los controles positivo y negativo se agregan al menos por duplicado (100 µl por pocillo).

b. Blanco de muestra (BM)

En cada placa se debe agregar un blanco de muestra (BM) constituido por el Diluyente de muestra. Dispensar directamente y por duplicado 100 µl por pocillo del Diluyente de muestra.

Preparación de las muestras

Las muestras de suero deben diluirse 1:200 utilizando el Diluyente de muestra. Para ello, agregar 4 µl de suero a 800 µl de Diluyente de muestra. Se utilizan 100 µl de muestra diluida por pocillo.

Notas:

-Pueden analizarse sueros frescos, refrigerados o congelados, libres de turbidez. Las muestras se pueden guardar en heladera durante 1 o 2 días. Para una conservación más prolongada, las muestras se deben conservar a -20°C y, en estos casos, se deben descongelar totalmente, llevar a temperatura ambiente y homogeneizar antes de realizar el análisis.

-Se recomienda analizar las muestras al menos por duplicado.

-Las muestras contaminadas y/o en mal estado pueden producir resultados erróneos.

Instrucciones de uso

1. Dejar que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (20-25°C). No retirar la placa de su envoltorio hasta que la misma haya alcanzado la temperatura ambiente.

2. Agregar por duplicado 100 µl por pocillo del control positivo, control negativo y blanco de muestra. Ver ítem-Preparación de los controles.

3. Agregar 100 µl por pocillo de cada

muestra de suero. Ver ítem-Preparación de las muestras.

4. Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente (20-25°C) con agitación orbital suave durante 1 hora.

5. Lavar 4 veces con 200 µl de Solución de lavado 1X por pocillo. Ver ítem Preparación de reactivos.

Nota: Retirar el líquido completamente después de cada lavado por volcado y golpeando la placa sobre material absorbente o aspiración con pipeta. Evitar que las placas se sequen entre los lavados y antes de agregar el reactivo siguiente.

6. Agregar 100 µl del Conjugado a cada pocillo. Ver ítem-Preparación del conjugado. Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente (20-25°C) con agitación orbital suave durante 1 hora.

7. Repetir el paso 5.

8. Agregar 100 µl de Solución sustrato-cromógeno en cada pocillo e incubar con agitación orbital suave durante 10 minutos (± 1 minuto) a temperatura ambiente (20-25°C) y en oscuridad (por ejemplo, cubrir la placa con papel aluminio). Comenzar a contar el tiempo luego de llenar el primer pocillo.

9. Detener la reacción agregando 100 µl de Solución de frenado en cada pocillo y mezclar cuidadosamente aplicando ligeros golpes en los bordes de la placa. La Solución de frenado debe agregarse en el mismo orden y velocidad que la Solución sustrato-cromógeno (ver paso 8).

10. Medir la absorbancia a 450 nm utilizando un espectrofotómetro de placas. No es necesario realizar una lectura de blanco. Realizar la lectura dentro de los 15 minutos después de haber agregado la solución de frenado.

Nota: muestras con altos valores de reactividad pueden dar lugar a la aparición de un precipitado del color negro debido a la precipitación del sustrato.

Cálculos

Expresión de los resultados

Los resultados se expresan como porcen-

taje de reactividad (PR) con respecto al control positivo incluido en cada ensayo ($PR_{CP} = 100\%$). Los valores de absorbancia medidos a 450 nm (Abs_{450}) de cada muestra y del control negativo (CN) se relacionan con el valor de Abs_{450} del control positivo (CP) de la siguiente forma:

$$PR_{CN} = \frac{\text{Promedio } Abs_{450} \text{ CN}}{\text{Promedio } Abs_{450} \text{ CP}} \times 100$$

$$PR_{\text{Muestra}} = \frac{Abs_{450} \text{ Muestra}^*}{\text{Promedio } Abs_{450} \text{ CP}} \times 100$$

* Abs_{450} promedio en caso de procesar las muestras por duplicado.

Criterios de validez de la prueba

Para confirmar la validez del ensayo deben cumplirse los siguientes criterios:

- El valor del promedio de Abs_{450} del CP debe ser mayor a 1,6 (Promedio Abs_{450} CP > 1,6).
- Los valores de Abs_{450} de los duplicados de los controles (CP y CN) y las muestras no deben diferir en más del 20% con respecto al promedio del duplicado.
- Los valores de Abs_{450} del Blanco de muestra (Bic Mtra) deben ser inferiores a 0,1 (Abs_{450} Bic Mtra < 0,1).
- El valor promedio de la Abs_{450} del CN debe ser menor a 0,12 (Promedio Abs_{450} CN < 0,12).
- La relación Promedio Abs_{450} CP / Promedio Abs_{450} CN debe ser mayor a 13 (Promedio Abs_{450} CP / Promedio Abs_{450} CN > 13).

Si no se cumple alguno de estos criterios, la prueba no se puede considerar válida. En este caso la prueba debe repetirse ajustándose estrictamente al procedimiento detallado en el manual de instrucciones incluido en el kit.

Interpretación de los resultados

Los resultados de las muestras deben interpretarse de la siguiente manera:

Suero (dilución 1:200)

PR	Interpretación
≤ 16%	No Reactivo
> 16 ≤ 26%	Indeterminado
> 26%	Reactivo

En caso de obtener un resultado "Indeterminado" la prueba se debe repetir con la misma muestra. Si el resultado es todavía indeterminado, se recomienda ensayar una segunda muestra obtenida después de un período de, por lo menos, 3 semanas. Si con la nueva muestra se obtiene nuevamente un resultado indeterminado, debería contemplarse la situación epidemiológica y analizar la muestra con otra técnica si esto fuera posible.

Sensibilidad y especificidad diagnóstica

Para determinar la sensibilidad (Se) y especificidad (Sp) diagnóstica del ensayo, se analizaron más de 320 muestras de suero obtenidas de pacientes con diagnóstico de Chagas agudo o crónico y de individuos sanos. A partir de los resultados obtenidos con estas muestras se realizó un ensayo por curvas ROC (receiver-operating-analysis). Este análisis permitió determinar el valor de corte que maximiza simultáneamente la Se y Sp, el valor de corte para el cual la Se es 100% y el punto de corte para alcanzar una Sp del 100%. El valor de corte que maximiza simultáneamente la Se y Sp (máximo valor del índice de Youden, J) coincide con el valor de corte para el cual la Se es máxima (Se = 100%) (ver Tabla 1).

Tabla 1

Sensibilidad, especificidad e índice de Youden del ensayo para distintos valores de corte.

Valor de corte (PR) ^a	Se (%) ^b	Sp (%) ^b	J ^c
16	100 (94,6-100)	99,6 (97,9-99,9)	0,996
26	97,0 (89,6-99,6)	100 (98,6-100)	0,970

(a) PR, porcentaje de reactividad.

(b) Se, sensibilidad (TP/TP+FN) x100; Sp, especificidad (TN/TN+FP) x100. Los valores entre paréntesis indican el intervalo de 95% de confianza. TP, positivo verdadero; TN, negativo verdadero; FP, falso positivo; FN, false negativo.

(c) J, índice de Youden (Se+Sp-1).

Referencias

-Cortina, María E.; Melli, Luciano J.; Roberti, Mariano; Mass, Mijal I.; Longinotti, Gloria; Tropea, Salvador; Lloret, Paulina; Rey Serantes, Diego; Salomón, Francisco; Lloret, Matías; Caillava, Ana J.; Restuccia, Sabrina; Altcheh, Jaime M.; Buscaglia, Carlos A.; Malatto, Laura; Ugalde, Juan E.; Fraigi, Liliana; Moina, Carlos; Ybarra, Gabriel; Ciocchini, Andrés E. and Comerci, Diego J.

Electrochemical magnetic microbeads-based biosensor for point-of-care serodiagnosis of infectious diseases.

Biosensors & Bioelectronics; 80; 6-2016; 24-33. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.01.021>.

Para asistencia técnica

Tel: (54-11) 2033-1455 (Ext. 6028)

info@chemtest.net

chemtest.net

CHEMLIS®
Chagas R-iELISA

Kit components

<i>Microplate</i>	96-well microtitre plate coated with the antigens, sealed and stored dry	2 microplates (192 tests)
<i>Conjugate</i>	Lyophilized (horseradish peroxidase conjugated anti-bovine IgG antibodies)	2 units
<i>Substrate-chromogen solution</i>	Ready to use [3,3',5,5'-Tetramethylbencidine in substrate buffer containing hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)]- STORE IN THE DARK	1 x 30 ml
<i>Stop solution</i>	Ready to use (contains HCl 1%) – CORROSIVE	1 x 30 ml
<i>Wash solution</i>	10X concentrate	1 x 120 ml, 10X (sufficient for 1.2 liters)
<i>Sample diluent</i>	To reconstitute - CONTAINS PRESERVATIVE [Thimerosal (C ₉ H ₉ HgNaO ₂ S) 0.01%].	2 x 120 ml
<i>Positive control</i>	Serum – CONTAINS PRESERVATIVE [Thimerosal (C ₉ H ₉ HgNaO ₂ S) 0.01%]	1 x 0.08 ml
<i>Negative control</i>	Serum – CONTAINS PRESERVATIVE [Thimerosal (C ₉ H ₉ HgNaO ₂ S) 0.01%]	1 x 0.08 ml
<i>Instruction manual</i>		1

Name and application

CHEMLIS® Chagas R-iELISA

Indirect ELISA kit for the detection of antibodies against *Trypanosoma cruzi* in human serum samples.

CHEMLIS® Chagas R-iELISA is an indirect ELISA kit (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) for the detection of IgG specific antibodies against *Trypanosoma cruzi*, causative agent of Chagas disease, in human serum. Thanks to its exclusive combination of four recombinant antigens, the kit has an excellent diagnostic performance. CHEMLIS® Chagas R-iELISA can be used as a screening and/or a confirmatory test.

Introduction

American Trypanosomiasis or Chagas disease is a major health and economic problem in Latin America caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. This parasite is found throughout the American continent in a variety of wild and domestic mammalian reservoirs and transmitted by the bite of infected, hematophagous triatomine insects. Apart from vectorial transmission, humans can become infected with *T. cruzi* by ingestion of contaminated food and fluids, from mother to child during pregnancy and through contaminated blood transfusion or organ transplantation. It is estimated that 10-12 million people are currently infected and that up to 120 million individuals living in endemic areas are at risk of infection, and thus at risk of developing cardiac or gut pathology normally associated with chronic Chagas Disease. Increasing travel and immigration has also brought the risk of *T. cruzi* infection into non-endemic countries such as Spain, Australia and the U.S., where some autochthonous cases of transmission have already been reported. Diagnosis of Chagas disease is challeng-

ing because it is often asymptomatic during the acute phase, and evolves into a chronic stage that has different clinical forms. In addition, and due to a major decline in parasitemia during the chronic phase of the disease, *T. cruzi* detection in blood samples by direct examination, blood-culture or xenodiagnosis is difficult as well as labor- and time-consuming. Therefore, detection of anti-*T. cruzi* antibodies in body fluids (typically blood samples) is still the most effective method for demonstrating direct exposure to the parasite. At present, the most widely used serologic methods are indirect hemagglutination assay (IHA), indirect immunofluorescence (IIF), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using total parasite homogenates or semi-purified antigenic fractions. In spite of their simplicity and low cost, these tests show variations in their reproducibility and reliability that can be attributed to the poor standardization of the antigens. The advent of recombinant DNA and peptide synthesis technologies allowed the production and one-step purification of large amounts of highly pure *T. cruzi* immunodominant antigens. An additional advantage of both recombinant antigens and synthetic peptides is that they minimize specificity problems, one of the major drawbacks of immunodiagnosis of Chagas disease.

Principles of the technique

CHEMLIS® Chagas R-iELISA kit is a solid phase enzyme immunoassay for the detection IgG antibodies against *Trypanosoma cruzi* in human serum samples. In this assay the antibodies present in the sample react with the recombinant antigens (exclusive combination of four recombinant proteins) that coat the wells. If the sample contains antibodies against these *Trypanosoma cruzi* proteins, they bind to the well. Upon addition of the horseradish peroxidase (HRP) conjugated antibody, a complex is formed with the IgG antibodies at-

tached to the antigen. Free antibodies are removed by washing before adding the substrate-chromogen solution. The blue color that appears is the product of the reaction of the substrate-chromogen with the conjugate and color intensity is directly proportional to the amount of antibodies present in the sample reacting with the antigens. The higher the antibody titer present in the sample, the more intense color develops in the test wells. Adding the stop solution, upon which a color change to yellow is observed, stops the reaction. The results are measured in a microplate spectrophotometer determining the absorbance (Abs) at 450 nm.

Kit components

-Microplate

96-well microtitre plate (12 x 8 strip wells with strip holder) coated with the antigens, sealed and stored dry.

-Wash solution

10X concentrate.

-Conjugate

Liophilized (horseradish peroxidase conjugated anti-bovine IgG antibodies).

-Substrate-chromogen solution

Ready to use [3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine in substrate buffer containing hydrogen peroxide (H₂O₂)]- STORE IN THE DARK.

-Stop solution

Ready to use (contains HCl 1%) – CORROSIVE.

-Sample diluent

To reconstitute - CONTAINS PRESERVATIVE [Thimerosal (C₉H₉HgNaO₂S) 0.01%].

-Positive Control

Serum – CONTAINS PRESERVATIVE [Thimerosal (C₉H₉HgNaO₂S) 0.01%].

-Negative Control

Serum – CONTAINS PRESERVATIVE [Thimerosal (C₉H₉HgNaO₂S) 0.01%].

-Instruction manual

Storage and expiration

Store at room temperature between 2 and 8°C. Transport temperature: 4 to

15°C for 72 hours. Proper storage of the kit and all reagents will allow the use until the expiration date.

Expiration: 12 months. Do not use reagents from different lots or after the expiration date.

Materials needed but not provided

-High precision multichannel pipette and micropipettes (10, 100 and 1000 µl).

-Containers for multichannel pipette.

-Disposable pipette tips.

-Microplate reader for absorbance determination at 450 nm.

-Orbital rotator.

-Timer.

-Tubes for the dilutions of the controls and samples.

-1 liter container for the preparation of the wash solution.

-Distilled water (Type II) or ultrapure water (Type I).

-Microplate covers (lid, aluminium foil or adhesive).

Precautions

1. Carefully read and strictly follow all instructions detailed in the leaflet included in the kit.

2. Store the kit and all reagents at 2-8 °C.

3. All reagents should equilibrate at room temperature (20-25°C) before use, and return to 2-8 °C following use.

4. Handle all materials and reagents according to the Good Laboratory Practices.

5. Serum samples, as well as positive and negative controls, should be considered potentially infectious and, therefore, the kit components that contact them should be handled with gloves and disposed as pathological waste according to legal regulations. The stop solution contains hydrochloric acid (corrosive). Skin contact generates irritation and should be handled with gloves. The rest of the kit components does not represent any potential risk for health and the environment.

6. Do not use the kit beyond expiration date or if the kit components were not kept in the conditions indicated above.

7. Do not mix components or instruction manuals from different test kits batches.

8. Care should be taken to avoid contamination of kit components.

9. If multichannel pipette containers are reused, they should be washed thoroughly with high quality water for reuse and identified to be used with the same solution.

10. Use different pipettes tips for each reagent and for each sample.

11. Include positive and negative controls, and the target sample in duplicate in each test.

12. For reconstitution of the reagents use only distilled water (Type II) or ultrapure water (Type I).

Preparation of reagents

a. Wash solution 1X

The 10X concentrated Wash solution should be brought to room temperature (20-25°C) and mixed to ensure dissolution of any precipitated salts.

The 10X concentrated Wash solution must be diluted 1/10 with distilled (Type II) or ultrapure (Type I) water; for example, adding 40 ml of 10X Wash solution to 360 ml of water (sufficient quantity of Wash solution 1X to process one microplate: 10 ml to reconstitute the IgG conjugate, 120 ml to reconstitute the Sample diluent and the rest for the washes). Mix very well before using. Once prepared, the 1X Wash solution can be stored at 2-8 °C for up to 7 days

b. Conjugate

Reconstitute the conjugate by adding 10 ml (per flask) of 1X Wash solution previously prepared (see previous item). Add the Washing solution carefully. Allow to stand for a minute and mix well. Prepare immediately before use.

For greater accuracy it is recommended to pipet the 10 ml using two calibration marks of the pipette (for example: pipetting twice from zero to 5 ml, or once from position -1 to 9 of the pipette).

The remaining conjugate can be aliquot-ed in Eppendorf type tubes and stored at -20°C (cannot be stored in the refrigerator) for up to 30 days. During this period of time each aliquot can be thaw and re-frozen one time.

c. Sample diluent

Reconstitute the Sample diluent by adding the 1X Wash solution previously prepared (see previous item) up to the level indicated in the corresponding bottle (approximately 60 ml) and mix very well. Prepare immediately before use.

The remaining Sample diluent can be stored in the refrigerator (2 to 8°C) up to 3 months or at -20°C for a year. Thaw it completely, bring to room temperature and mix very well until complete dissolution before using.

Preparation of controls

a. Positive and negative controls

In tubes of 1.5 ml add 4 µl of each control to 800 µl of Sample diluent (1:200 dilution). Mix well before using. In each microplate positive and negative controls should be added at least in duplicate (100 µl per well).

b. Sample blank (SB)

On each plate a sample blank consisting of Sample diluent should be added. Dispense directly and in duplicate 100 µl per well of Sample diluent.

Sample preparation

Serum samples should be diluted 1:00 using the Sample diluent. Add 4 µl of serum to 800 µl of Sample diluent. Use 100 µl of diluted sample per well.

Notes:

-Fresh, chilled or frozen serum samples, free of turbidity, can be analyzed. Samples can be stored in a refrigerator for 1 or 2 days. For longer periods store at -20°C and, in these cases, the samples should be completely thawed, bringing them to room temperature, and homogenized before performing the analysis.

-It is recommended to analyze the samples at least in duplicate.

-Samples contaminated and/or not well conserved may produce erroneous results.

Instructions for the analysis

1. Allow the reagents equilibrate to room temperature (20-25°C). Do not remove the plate from its pouch until it has reached room temperature.

2. Add in duplicate 100 µl per well of the positive control, negative control and sample blank. See Item Preparation of controls.

3. Add 100 µl per well of each serum sample. See Item Sample preparation.

Note: samples can be processed in a single well or in duplicate. However, to obtain more reliable results it is recommended to run samples at least in duplicates.

4. Cover the plate and incubate at room temperature (20-25°C) with gentle orbital shaking for 1 hour.

5. Wash/rinse the plates 4 times with 200 µl of 1X Wash Solution per well. See item Reagents preparation.

Note: Remove the liquid completely after each washing by dump and tapping onto absorbent material or aspiration with pipette. Avoid plate drying between plate washings and before adding the next reagent.

6. Add 100 µl of Conjugate to each well. See item Preparation of the conjugate. Cover the plate and incubate at room temperature (20-25°C) with gentle orbital shaking for 1 hour.

7. Repeat step 5.

8. Add 100 µl of Substrate-chromogen solution to each well, and incubated with gentle orbital shaking for 10 minutes (± 1 min) at room temperature (20-25°C) and in the dark (for example, cover the plate with aluminum foil). Start counting the time after filling the first well.

9. Stop the reaction by adding 100 µl of Stop solution into each well and mix thoroughly by lightly tapping the edges of the plate. This solution must be added in the same order and speed as the Substrate-chromogen solution (see Step 8).

10. Measure the absorbance at 450 nm using a plate spectrophotometer. There is no need to perform a blank reading. Perform the reading within 15 minutes after adding the stop solution.

Note: samples with high reactivity values can lead to the appearance of a black precipitate due to the precipitation of the substrate.

Calculations

Expression of results

Results are expressed as the percentage of reactivity ($PR_{PC} = 100\%$) with respect to the positive control included in each test. The absorbance values measured at 450 nm (Abs_{450}) of each sample and the negative control (NC) are related to the Abs_{450} value of the positive control (PC) as follows:

$$PR_{CN} = \frac{\text{Average } Abs_{450} \text{ NC}}{\text{Average } Abs_{450} \text{ PC}} \times 100$$

$$PR_{\text{Sample}} = \frac{Abs_{450} \text{ Sample}^*}{\text{Average } Abs_{450} \text{ PC}} \times 100$$

* If the sample was run in duplicate, consider the average of the Abs_{450} value.

Validity criteria

To confirm the validity of the test the following criteria must be met:

- The average value of the PC (Abs_{450}) must be higher than 1.6 ($Abs_{450} \text{ PC} > 1.6$).
- The Abs_{450} values of the controls (PC and NC) and samples duplicates must not differ by more than 20% of the corresponding average.
- The Abs_{450} values of the blank sample

must be less than 0.1 (Abs_{450} Blank sample < 0.1).

- The average Abs_{450} value of the NC must be less than 0,12 (Average Abs_{450} NC < 0.12).
- The Average Abs_{450} PC / Average Abs_{450} NC ratio must be higher than 13 (Average Abs_{450} PC / Average Abs_{450} NC > 13).

If any of these criteria is not fulfilled, the test is considered invalid. In this case, the test should be repeated strictly following the instructions detailed in the Instruction manual included in the kit.

Interpretation of results

The test sample results should be interpreted as follows:

Serum (dilution 1:200)

PR	Interpretation
≤ 16%	Non-Reactive
> 16% to ≤ 26%	Indeterminate
> 26%	Reactive

In the case of obtaining an "Indeterminate" result, the sample should be re-tested. If the result is still indeterminate, it is recommended to test a second sample obtained after a period of at least three weeks. If the new sample is indeterminate again, the epidemiological situation should be considered and the sample should be analyzed with another technique if available.

Diagnostic sensitivity and specificity

More than 320 serum samples obtained from patients with acute or chronic Chagas disease and from healthy donors were analyzed to determine the diagnostic sensitivity (Se) and specificity (Sp) of the assay. Based on these results, a ROC (receiver-operating-analysis) curve analysis was performed. This analysis allowed us to select the cut-off value that concurrently optimized the Se and Sp of the assay and the cut-off values for which a

100 % Se or Sp was achieved. The cut-off value that simultaneously maximized the Se and Sp (maximum value of the Youden's index, J) matches the cut-off value for which the Se is 100% (see Table 1).

Table 1

Sensitivity, specificity and Youden's index.

Cut-off (PR) ^a	Se (%) ^b	Sp (%) ^b	J ^c
16	100 (94.6-100)	99,6 (97,9-99,9)	0.996
26	97,0 (89,6-99,6)	100 (98,6-100)	0,970

(a) PR, percentage of reactivity.

(b) Se, sensitivity (TP/TP+FN) x100; Sp, specificity (TN/TN+FP) x100. Values in parentheses indicate the 95% confidence interval. TP, true positive; TN, true negative; FP, false positive; FN, false negative.

(c) J, Youden's index (Se+Sp-1).

References

- Cortina, María E.; Melli, Luciano J.; Roberti, Mariano; Mass, Mijal I.; Longinotti, Gloria; Tropea, Salvador; Lloret, Paulina; Rey Serantes, Diego; Salomón, Francisco; Lloret, Matías; Caillava, Ana J.; Restuccia, Sabrina; Altcheh, Jaime M.; Buscaglia, Carlos A.; Malatto, Laura; Ugalde, Juan E.; Fraigi, Liliana; Moína, Carlos; Ybarra, Gabriel; Ciocchini, Andrés E. and Comerci, Diego J.
Electrochemical magnetic microbeads-based biosensor for point-of-care serodiagnosis of infectious diseases.
Biosensors & Bioelectronics; 80; 6-2016; 24-33. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.01.021>.

For technical assistance

Tel: (54-11) 2033-1455 (Ext. 6028)
info@chemtest.net
chemtest.net



Elisa



Humano



Chemtest S.A.

Av. 25 de Mayo 1021, San Martín (C.P. 1650), Buenos Aires, Argentina.

info@chemtest.net - chemtest.net