

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



Instruction for use

Chagas (Trypanosoma cruzi) IgG – ELISA

Enzyme immunoassay for the qualitative determination of IgG-class antibodies against Chagas (Trypanosoma cruzi) in human serum or plasma



DENO0114



96 Tests

1. INTRODUCTION

Chagas' disease occurs in Middle and South America. It is an infectious disease transmitted to humans through the bite wound caused by an infected bug of the family reduviidae. The infection is caused by *Trypanosoma cruzi* a unicellular parasite. The infection passes through different phases and causes an often chronic disease. 4 to 5 million people in South America are suffering from it. People living under poor conditions are mainly jeopardized. Up to 10 % of all infections are fatal; babies and neonates have a special risk.

The infection is transmitted to humans by different bug species of the family reduviidae. The parasite does not enter the human body with the bit of the bug. *Trypanosoma cruzi* lives in faeces of the bug and invades into humans by skin wounds. Newborns are at risk by infection in utero. An infection via blood transfusion is also possible.

1-2% of all infected people show symptoms after an incubation time of one to four weeks. Children up to 15 years old are mainly affected. The disease passes through three different phases.

During acute phase fever, diarrhoea, gripes, swollen lymph nodes and swelling of the whole body appears. Especially in neonates and infants inflammation of heart or brain are possible. The acute phase lasts for ca. 4 weeks. The acute Chagas disease is mostly a disease of children. In many cases the disease is healed up.

The following latency period is characterized by lack of symptoms for most of the patients. Occasionally a weakening of the immune system takes place. This phase can last several years.

10 to 20 % of infected people reach the chronic phase. Different inner organs like heart, intestinal tract or neuronal system can be affected. Patients often die by sudden cardiac death or as the result of a chronic heart insufficiency. The prognosis depends upon the degree of heart variance.

A variety of diagnostic methods have been used, but detection of antibodies to *T. cruzi* antigens remains the strongest method to diagnose infection.

2. INTENDED USE

The Demeditec Chagas (*Trypanosoma cruzi*) IgG-ELISA is intended for the qualitative determination of IgG class antibodies against *Trypanosoma cruzi* in human serum or plasma (citrate).

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The qualitative immunoenzymatic determination of IgG-class antibodies against Chagas (*Trypanosoma cruzi*) is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique.

Microtiter strip wells are precoated with *Trypanosoma cruzi* antigens to bind corresponding antibodies of the specimen. After washing the wells to remove all unbound sample material horseradish peroxidase (HRP) labelled Protein A conjugate is added. This conjugate binds to antigen-antibody complexes. The immune complex formed by the bound conjugate is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product.

The intensity of this product is proportional to the amount of *Trypanosoma cruzi*-specific IgG antibodies in the specimen. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450 nm is read using an ELISA microwell plate reader.

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

Chagas Coated Wells (IgG): 12 breakapart 8-well snap-off strips coated with Trypanosoma cruzi antigens; in resealable aluminium foil.

IgG Sample Diluent *:** 1 bottle containing 100 ml of buffer for sample dilution; pH 7.2 ± 0.2; coloured yellow; ready to use; white cap.

Stop Solution: 1 bottle containing 15 ml sulphuric acid, 0.2 mol/l; ready to use; red cap.

Washing Solution (20x conc.): 1 bottle containing 50 ml of a 20-fold concentrated buffer (pH 7.2 ± 0.2) for washing the wells; white cap.

Protein A Conjugate:** 1 bottle containing 20 ml of peroxidased Protein A; coloured blue, ready to use; black cap.

TMB Substrate Solution: 1 bottle containing 15 ml 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB); ready to use; yellow cap.

Chagas IgG Positive Control*:** 1 bottle containing 2 ml; coloured yellow; ready to use; red cap.

Chagas IgG Cut-off Control*:** 1 bottle containing 3 ml; coloured yellow; ready to use; green cap.

Chagas IgG Negative Control*:** 1 bottle containing 2 ml; coloured yellow; ready to use; blue cap.

* contains 0.1 % Bronidox L after dilution

** contains 0.2 % Bronidox L

*** contains 0.1 % Kathon

4.2. Materials supplied

- 1 Strip holder
- 1 Cover foil
- 1 Test protocol
- 1 distribution and identification plan

4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA microwell plate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620nm
- Incubator 37°C
- Manual or automatic equipment for rinsing wells
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 µl
- Vortex tube mixer
- Deionised or (freshly) distilled water
- Disposable tubes
- Timer

5. STABILITY AND STORAGE

The reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2...8 °C.

6. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents, samples and controls to room temperature (20...25 °C) before starting the test run!

6.1. Coated snap-off strips

The ready to use breakapart snap-off strips are coated with Trypanosoma cruzi antigen. Store at 2...8 °C. *Immediately after removal of strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C; stability until expiry date.*

6.2. Protein A Conjugate

The bottle contains 20 ml of a solution with Protein A, horseradish peroxidase, buffer, stabilizers, preservatives and an inert blue dye. The solution is ready to use. Store at 2...8 °C. *After first opening stability until expiry date when stored at 2...8 °C.*

6.3. Controls

The bottles labelled with Positive, Cut-off and Negative Control contain a ready to use control solution. It contains 0.1% Kathon and has to be stored at 2...8 °C. *After first opening stability until expiry date when stored at 2...8 °C.*

6.4. IgG Sample Diluent

The bottle contains 100 ml phosphate buffer, stabilizers, preservatives and an inert yellow dye. It is used for the dilution of the patient specimen. This ready to use solution has to be stored at 2...8 °C. *After first opening stability until expiry date when stored at 2...8 °C.*

6.5. Washing solution (20xconc.)

The bottle contains 50 ml of a concentrated buffer, detergents and preservatives. Dilute Washing Solution 1+19; e.g. 10 ml Washing Solution + 190 ml fresh and germ free redistilled water. The diluted buffer is stable for 5 days at room temperature. *Crystals in the solution disappear by warming up to 37 °C in a water bath. After first opening the concentrate is stable until the expiry date.*

6.6. TMB Substrate Solution

The bottle contains 15 ml of a tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide system. The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8 °C, away from the light. *The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away. After first opening stability until expiry date when stored at 2...8 °C.*

6.7. Stop Solution

The bottle contains 15 ml 0.2 M sulphuric acid solution (R 36/38, S 26). This ready to use solution has to be stored at 2...8 °C. *After first opening stability until expiry date.*

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Use human serum or plasma (citrate) samples with this assay. If the assay is performed within 5 days after sample collection, the specimen should be kept at 2...8 °C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-70...-20 °C). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. *Avoid repeated freezing and thawing.*

Heat inactivation of samples is not recommended.

7.1. Sample Dilution

Before assaying, all samples should be diluted 1+100 with IgG Sample Diluent. Dispense 10 µl sample and 1 ml IgG Sample Diluent into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Test Preparation

Please read the test protocol carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the test protocol as described. The following test procedure is only validated for manual procedure. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend to increase the washing steps from three to five and the volume of washing solution from 300µl to 350µl to avoid washing effects. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all specimens and controls should be carefully established on the result sheet supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Please allocate at least:

- 1 well (e.g. A1) for the substrate blank,
- 1 well (e.g. B1) for the negative control,
- 2 wells (e.g. C1+D1) for the cut-off control and
- 1 well (e.g. E1) for the positive control.

It is recommended to determine controls and patient samples in duplicate.

Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each control and sample.

Adjust the incubator to $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

1. Dispense 100µl controls and diluted samples into their respective wells. Leave well A1 for substrate blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour \pm 5 min at $37\pm 1^{\circ}\text{C}$.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300µl of Washing Solution. Avoid overflows from the reaction wells. The soak time between each wash cycle should be $>5\text{sec}$. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!

Note: Washing is critical! Insufficient washing results in poor precision and falsely elevated absorbance values.

5. Dispense 100µl Protein A conjugate into all wells except for the blank well (e.g. A1). Cover with foil.
6. **Incubate for 30 min at room temperature. Do not expose to direct sunlight.**
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100µl TMB Substrate Solution into all wells
9. **Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark.**
10. Dispense 100µl Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution.

Any blue colour developed during the incubation turns into yellow.

Note: Highly positive patient samples can cause dark precipitates of the chromogen! These precipitates have an influence when reading the optical density. Predilution of the sample with physiological sodium chloride solution, for example 1+1, is recommended. Then dilute the sample 1+100 with dilution buffer and multiply the results in NTU by 2.

11. Measure the absorbance of the specimen at 450/620nm within 30 min after addition of the Stop Solution.

8.2. Measurement

Adjust the ELISA Microwell Plate Reader **to zero** using the **substrate blank in well A1**.

If - due to technical reasons - the ELISA reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in well A1, subtract the absorbance value of well A1 from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each control and patient sample in the distribution and identification plan.

Dual wavelength reading using 620 nm as reference wavelength is recommended.

Where applicable calculate the **mean absorbance values** of all duplicates.

9. RESULTS

9.1. Run Validation Criteria

In order for an assay to be considered valid, the following criteria must be met:

- **Substrate blank** in A1: Absorbance value < **0.100**.
- **Negative control** in B1: Absorbance value < **0.200 and < cut-off**
- **Cut-off control** in C1 and D1: Absorbance value **0.150 – 1.30**.
- **Positive control** in E1: Absorbance value > **cut-off**.

If these criteria are not met, the test is not valid and must be repeated.

9.2. Calculation of Results

The cut-off is the mean absorbance value of the Cut-off control determinations.

Example: Absorbance value Cut-off control 0.39 + absorbance value Cut-off control 0.37 = 0.76 / 2 = 0.38

Cut-off = 0.38

9.3. Interpretation of Results

Samples are considered **POSITIVE** if the absorbance value is higher than 10% over the cut-off.

Samples with an absorbance value of 10% above or below the cut-off should not be considered as clearly positive or negative

→ **grey zone**

It is recommended to repeat the test again 2 - 4 weeks later with a fresh sample. If results in the second test are again in the grey zone the sample has to be considered **NEGATIVE**.

Samples are considered **NEGATIVE** if the absorbance value is lower than 10% below the cut-off.

9.3.1. Results in Units

$$\frac{\text{Patient (mean) absorbance value} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{Units} = \text{U}]$$

Example: $\frac{1.204 \times 10}{0.38} = 32 \text{ U (Units)}$

Cut-off:	10	U
Grey zone:	9-11	U
Negative:	<9	U
Positive:	>11	U

10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

10.1. Precision

Interassay	n	Mean (U)	Cv (%)
Neg. Serum	4	5.7	10.2
Pos. Serum	7	13.5	7.7
Intraassay	n	Mean (E)	Cv (%)
Pos. Serum	15	0.61	7.8

10.2. Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte.

It is 99 %.

10.3. Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte.

It is 99 %.

10.4. Interferences

Interferences with hemolytic, lipemic or icteric sera are not observed up to a concentration of 10 mg/ml hemoglobin, 5 mg/ml triglycerides and 0.2 mg/ml bilirubin.

Note: The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications.

11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the specimen may affect the absorbance values. Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as serological data.

In immunocompromised patients and newborns serological data only have restricted value.

Cross reaction of the antigens with antibodies against Leishmania, Trypanosoma brucei rhodesiense and Trypanosoma brucei gambiense cannot be excluded.

12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- In compliance with article 1 paragraph 2b European directive 98/79/EC the use of the in vitro diagnostic medical devices is intended by the manufacturer to secure suitability, performances and safety of the product. Therefore the test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive. Nevertheless, all materials should still be regarded and handled as potentially infectious.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- The NovaLisa™ ELISA is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.

WARNING: In the used concentration Bronidox L has hardly any toxicological risk upon contact with skin and mucous membranes!

WARNING: Sulphuric acid irritates eyes and skin. Keep out of the reach of children. Upon contact with the eyes, rinse thoroughly with water and consult a doctor!

12.1. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

1. EINLEITUNG

Die Chagas-Krankheit ist eine in Mittel- und Südamerika vorkommende, durch Parasiten verursachte Infektionskrankheit, die durch Raubwanzenbisse übertragen wird. Die Infektion wird durch *Trypanosoma cruzi*, einen einzelligen Parasiten, ausgelöst. Die Infektion durchläuft verschiedene Stadien und verursacht eine oft chronische Erkrankung unter der in den südamerikanischen Ländern schätzungsweise vier bis fünf Millionen Menschen leiden. Gefährdet sind vor allem Personen, die in sehr einfachen Verhältnissen leben. Insgesamt endet die Chagas-Erkrankung in bis zu zehn Prozent tödlich, wobei Säuglinge und Kleinkinder besonders gefährdet sind.

Die Infektion wird durch verschiedene Raubwanzenarten auf den Menschen übertragen. Die Eintrittspforte ist dabei nicht der Biss der Wanze, sondern kleine Hautdefekte, durch die die Erreger aus dem Kot der Wanzen eintreten können. Die Erkrankung kann auch vor bzw. während der Geburt von der erkrankten Mutter auf ihr Kind übertragen werden. Eine Übertragung bei Bluttransfusionen ist ebenfalls möglich.

Nach einer Inkubationszeit von einer bis vier Wochen entstehen bei etwa ein bis zwei Prozent der Infizierten Symptome. In erster Linie sind Kinder und Jugendliche unter 15 Jahren betroffen. Die Krankheit verläuft in drei Phasen.

Bei der **akuten Phase** treten Fieber, Luftnot, Durchfall, Bauchschmerzen, Lymphknotenschwellungen und Schwellungen am ganzen Körper auf. Insbesondere bei Neugeborenen oder Kleinkindern kommt es auch zu einer Entzündung des Herzens oder des Gehirns. Diese akute Phase klingt nach etwa vier Wochen ab. Die akute Chagas Krankheit ist zumeist eine Erkrankung von Kindern. In vielen Fällen ist die Krankheit damit ausgeheilt.

In der sich anschließenden **Latenzphase**, die mitunter mehrere Jahre andauern kann, sind die meisten Patienten symptomfrei. Selten kommt es zu einer Schwächung des Immunsystems.

Bei etwa 10 bis 20 Prozent der infizierten Personen kommt es zur **chronischen Phase**. Verschiedene innere Organe wie Herz, Magen-Darm-Trakt oder Nervensystem sind dann betroffen. Häufig versterben die Patienten durch einen plötzlichen Herztod oder aber als Folge der sich entwickelnden chronischen Herzinsuffizienz. Die Prognose der Erkrankung hängt in hohem Maße von den Herzveränderungen ab.

Verschiedene diagnostische Methoden sind bisher getestet worden, aber der Nachweis von Antikörpern gegen *Trypanosoma cruzi* bleibt die beste Methode für die Diagnose der Infektion.

2. VERWENDUNGSZWECK

Der Demeditec Chagas (*Trypanosoma cruzi*) IgG ELISA ist für den qualitativen Nachweis spezifischer IgG-Antikörper gegen *Trypanosoma cruzi* in humanem Serum oder Plasma (Citrat) bestimmt.

3. TESTPRINZIP

Die qualitative immunoenzymatische Bestimmung von spezifischen IgG-Antikörpern gegen Chagas (*Trypanosoma cruzi*) beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)-Technik.

Mikrotiterstreifen als solide Phase sind beschichtet mit *Trypanosoma cruzi* spezifischen Antigenen. Vorhandene spezifische Antikörper in der Probe binden an die immobilisierten Antigene der Mikrotiterplatte. Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugiertes Protein A bindet an Antigen-Antikörperkomplexe in positiven Proben. Die entstandenen Immunkomplexe werden durch Blaufärbung nach Inkubation mit Tetramethylbenzidin (TMB) -Substratlösung nachgewiesen. Stoppen der enzymatischen Reaktion mit Schwefelsäure führt zu einem Farbumschlag von blau zu gelb, der einfach nachgewiesen und mit einem ELISA-Reader bei 450nm gemessen werden kann.

4. MATERIALIEN

4.1. Mitgelieferte Reagenzien

Chagas beschichtete Mikrotiterstreifen (IgG): 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit Trypanosoma cruzi Antigen; in wieder verschließbarem Aluminiumbeutel.

IgG-Probenverdünnungspuffer*:** 1 Flasche mit 100 ml Puffer zur Probenverdünnung; pH 7.2 ± 0.2; gelb gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe.

Stopplösung: 1 Fläschchen mit 15 ml Schwefelsäure, 0.2mol/l, gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe.

Waschlösung (20x konz.): 1 Flasche mit 50 ml eines 20-fach konzentrierten Puffers zum Waschen der Kavitäten; pH 7.2 ± 0.2; weiße Verschlusskappe.

Protein A Konjugat:** 1 Flasche mit 20 ml Peroxidase-konjugiertem Protein A; blau gefärbt; gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe.

TMB-Substratlösung: 1 Fläschchen mit 15 ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB); gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe.

Chagas IgG Positivkontrolle*:** 1 Fläschchen mit 2 ml; gelb gefärbt; rote Verschlusskappe; gebrauchsfertig.

Chagas IgG Cut-off Kontrolle*:** 1 Fläschchen mit 3 ml; gelb gefärbt; grüne Verschlusskappe; gebrauchsfertig.

Chagas IgG Negativkontrolle*:** 1 Fläschchen mit 2 ml; gelb gefärbt; blaue Verschlusskappe; gebrauchsfertig.

* enthält 0.1% Bronidox L nach Verdünnung

** enthält 0.2% Bronidox L

*** enthält 0.1% Kathon

4.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Rahmenhalter
- 1 Arbeitsanleitung
- 1 Ergebnisblatt

4.3. Erforderliche Materialien und Geräte

- Photometer mit Filtern 450/620 nm
- Feuchtkammer/Brutschrank mit Thermostat
- Manuelle oder automatische Waschorruchtung
- Mikropipetten mit Einmalspitzen (10, 100, 200, 1000 µl)
- Vortex-Mischer
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch
- Röhrchen-Ständer
- Aqua dest.
- Timer

5. STABILITÄT UND LAGERUNG

Testkit bei 2...8°C lagern. Die Reagenzien nicht nach den angegebenen Verfallsdaten verwenden. Die Verfallsdaten sind jeweils auf den Flaschenetiketten und auf dem Außenetikett angegeben.

6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Alle Reagenzien, Proben und Kontrollen sind vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur (20...25°C) zu bringen!

6.1. Beschichtete Streifen

Die abbrechbaren Streifen sind mit inaktiviertem Trypanosoma cruzi Antigen beschichtet. Die gebrauchsfertigen Vertiefungen sind bei 2...8°C aufzubewahren. *Nichtverbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2...8°C lagern. Haltbarkeit bis zum angegebenen Verfallsdatum.*

6.2. Protein A Konjugat

Die Flasche enthält 20 ml einer Lösung von Protein A, Meerrettichperoxidase, Puffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einem inerten blauen Farbstoff. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.3. Kontrollen

Die Fläschchen mit Kontrollen enthalten eine gebrauchsfertige Kontrolllösung. Die gebrauchsfertigen Lösungen sind bei 2...8°C aufzubewahren und enthalten 0.1% Kathon. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.4. IgG-Probenverdünnungspuffer

Die Flasche enthält 100 ml Phosphatpuffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten gelben Farbstoff. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren. Die Lösung wird für die Verdünnung der Proben eingesetzt. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.5. Waschlösung (20x konz.)

Die Flasche enthält 50 ml konzentrierten Puffer, Detergenzien und Konservierungsmittel. Der Inhalt wird auf einen Liter mit Aqua dest. verdünnt (1+19). Der verdünnte Puffer ist bei Raumtemperatur 5 Tage haltbar. Die Waschlösung wird zum Waschen der Streifen eingesetzt. *Sollte eine Kristallisation im Konzentrat auftreten, die Waschlösung auf 37°C erwärmen und vor dem Verdünnen gut mischen. Nach dem ersten Öffnen Konzentrat haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.6. TMB-Substratlösung

Das Fläschchen enthält 15 ml eines Tetramethylbenzidin/Wasserstoffperoxidgemisches. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C vor Licht geschützt aufzubewahren. *Die Lösung ist leicht hellblau. Sollte die TMB-Substratlösung dunkelblau sein, ist sie kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden. Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum Verfallsdatum bei sachgerechter Lagerung von 2...8°C.*

6.7. Stopplösung

Das Fläschchen enthält 15 ml 0,2 M Schwefelsäure (R36/38, S26). Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

7. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Es sollten humane Serum- oder Plasmaproben (Citrat) verwendet werden. Werden die Bestimmungen innerhalb von 5 Tagen nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei 2...8°C aufbewahrt werden, sonst tiefgefrieren (-70...-20°C). Wiederaufgetaute Proben vor dem Verdünnen gut schütteln. *Wiederholtes Tiefgefrieren und Auftauen vermeiden!*
Hitzeinaktivierung der Proben wird nicht empfohlen.

7.1. Probenverdünnung

Proben vor Testbeginn im Verhältnis 1+100 mit IgG-Probenverdünnungspuffer verdünnen, z.B. 10µl Probe und 1 ml IgG-Probenverdünnungspuffer in die entsprechenden Röhrchen pipettieren, um eine Verdünnung von 1+100 zu erhalten; gut mischen (Vortex).

8. TESTDURCHFÜHRUNG

8.1. Testvorbereitung

Gebrauchsinformation **vor** Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Arbeitsanleitung genau zu befolgen. Die folgende Testdurchführung ist für die manuelle Methode validiert. Beim Arbeiten mit ELISA Automaten empfehlen wir, um Wascheffekte auszuschließen, die Zahl der Waschschrte von drei auf fünf und das Volumen der Waschlösung von 300 µl auf 350 µl zu erhöhen. Vor Testbeginn auf dem mitgelieferten Ergebnisblatt die Verteilung bzw. Position der Patientenproben und Standards auf den Mikrotiterstreifen genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen.

Hierbei mindestens

- | | |
|-----------------------------|-------------------------------------|
| 1 Vertiefung (z.B. A1) | für den Substratleerwert (Blank), |
| 1 Vertiefung (z.B. B1) | für die Negativ Kontrolle und |
| 2 Vertiefungen (z.B. C1+D1) | für die Cut-off Kontrolle und |
| 1 Vertiefung (z.B. E1) | für die Positiv Kontrolle vorsehen. |

Prinzipien der Qualitätssicherung in der Laboratoriumsmedizin erfordern zur höheren Sicherheit für Kontrollen und Patientenproben mindestens Doppelbestimmungen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Kontrollen und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

Den Brutschrank auf $37 \pm 1^\circ\text{C}$ einstellen.

1. Je 100 µl Kontrollen und vorverdünnte Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Vertiefung A1 ist für den Substratleerwert vorgesehen.
2. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
3. **1 h \pm 5 min bei 37°C inkubieren.**
4. Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend dreimal mit 300µl Waschlösung waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte mindestens 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen mit den Öffnungen nach unten kurz auf Fliesspapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.

***Beachte:** Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falsch erhöhten Messergebnissen führt!*

5. 100µl Protein A Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes vorgesehenen, pipettieren. Mit Folie abdecken.
6. **30 min bei Raumtemperatur (20...25°C) inkubieren.** Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.
7. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
8. 100µl TMB-Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren.
9. **Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20...25°C) inkubieren.**
10. In alle Vertiefungen 100µl Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei der TMB-Substratlösung Zugabe pipettieren. Während der Inkubation gebildete blaue Farbe schlägt in gelb um.

***Hinweis:** Hochpositive Patientenproben können schwärzliche Präzipitate des Chromogens verursachen! Diese Präzipitate beeinflussen die Messwerte. Es wird empfohlen, die Patientenprobe mit physiologischer Kochsalzlösung 1 + 1 zu verdünnen und anschließend die verdünnte Probe mit IgG-Probenverdünnungspuffer 1 + 100 für den Test vorzubereiten. Das Ergebnis in NTU wird in diesem Fall mit zwei multipliziert.*

11. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopplösung messen

8.2. Messung

Mit Hilfe des Substratleerwertes (Blank) **in A1** den **Nullabgleich** des Mikrotiterplatten-Photometers (ELISA-Readers) vornehmen.

Falls diese Eichung aus technischen Gründen nicht möglich ist, muss nach der Messung der Extinktionswert der Position A1 von allen anderen Extinktionswerten abgezogen werden, um einwandfreie Ergebnisse zu erzielen!

Extinktion aller Kavitäten bei **450 nm** messen und die Messwerte der Kontrollen und Proben in das Ergebnisblatt eintragen.

Eine **bichromatische** Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.

Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den **Mittelwert der Extinktionswerte** berechnen.

9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

9.1. Testgültigkeitskriterien

Der Test wurde richtig durchgeführt, wenn er folgende Kriterien erfüllt:

- **Substrat-Leerwert** in A1: Extinktion < **0,100**
- **Negativ Kontrolle** in B1: Extinktion < **0,200 und < cut-off**
- **Cut-off Kontrolle** in C1 und D1: Extinktionswerte **0,150 – 1,300**
- **Positiv Kontrolle** in E1: Extinktionswerte > **Cut-off**

Sind diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Testlauf ungültig und muss wiederholt werden.

9.2. Messwertberechnung

Der Cut-off ergibt sich aus dem Mittelwert der gemessenen Extinktionen der beiden Cut-off Kontrollen.

Beispiel: $0.37 \text{ OD Cut-off Kontrolle} + 0.39 \text{ OD Cut-off Kontrolle} = 0.76 : 2 = \underline{0.38}$

Cut-off = 0.38

9.3. Interpretation der Ergebnisse

Patientenproben gelten als **positiv**, wenn der Extinktionswert mindestens 10% höher liegt als der Cut-Off.

Patientenproben mit Extinktionswerten 10% über bzw. unter dem Cut-Off können nicht eindeutig als positiv bzw. negativ angesehen werden → **Grauzone**

Es wird empfohlen den Test nach 2 bis 4 Wochen mit einer frischen Patientenprobe zu wiederholen. Finden sich die Ergebnisse erneut innerhalb der Grauzone, gilt die Probe als **negativ**.

Patientenproben gelten als **negativ**, wenn der Extinktionswert mindestens 10% unterhalb des Cut-Offs liegt.

9.3.1. Ergebnisse in Einheiten [U]

$\frac{\text{Mittlere Extinktion der Patientenprobe} \times 10}{\text{Cut-Off}} = [\text{Einheiten} = \text{U}]$

Beispiel: $\frac{1.786 \times 10}{0.38} = 47 \text{ U (Units)}$

Cut-Off:	10	U
Grauzone:	9-11	U
Negativ:	<9	U
Positiv:	>11	U

10. TESTMERKMALE**10.1. Präzision**

Interassay	n	Mittelwert (U)	Vk (%)
Neg. Serum	4	5.7	10.2
Pos. Serum	7	13.5	7.7
Intraassay	n	Mittelwert (OD)	Vk (%)
Pos. Serum	15	0.61	7.8

10.2. Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. Sie beträgt 99 %.

10.3. Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern. Sie ist 99 %.

10.4. Interferenzen

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben ergaben bis zu einer Konzentration von 10 mg/ml für Hämoglobin, von 5 mg/ml Triglyceride und von 0,2 mg/ml für Bilirubin keine Interferenzen im vorliegenden ELISA.

Hinweis: Die Ergebnisse beziehen sich auf die untersuchten Probenkollektive; es handelt sich nicht um garantierte Spezifikationen.

11. GRENZEN DES VERFAHRENS

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen. Die Diagnose einer Infektionskrankheit darf nicht allein auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden. Die anamnestischen Daten sowie die Symptomatologie des Patienten müssen zusätzlich zu den serologischen Ergebnissen in Betracht gezogen werden. Bei Immunsupprimierten und Neugeborenen besitzen die Ergebnisse der serologischen Tests nur einen begrenzten Wert.

Eine Kreuzreaktion mit Leishmania, Trypanosoma brucei rhodesiense und Trypanosoma brucei gambiense kann nicht ausgeschlossen werden.

12. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Gemäß Art. 1 Abs. 2b der EU-Richtlinie 98/79/EG legt der Hersteller die Zweckbestimmung von In-vitro-Diagnostika fest, um deren Eignung, Leistung und Sicherheit sicherzustellen. Daher sind die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Gebrauchsanweisung strikt zu befolgen. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund von visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
- Nur für in-vitro-Diagnostik.
- Alle verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs sind auf Anti-HIV-AK, Anti-HCV-AK und HBsAG nicht-reaktiv getestet. Dennoch sind alle Materialien als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- Reagenzien und Mikrotiterplatten unterschiedlicher Chargen nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat- und Standardfläschchen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.

- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten Patientenproben und Konjugat sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Der NovaLisa™ ELISA ist nur für die Anwendung durch Fachpersonal vorgesehen, welches die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.

WARNUNG: Bronidox L zeigt in der verwendeten Konzentration nahezu keine toxikologischen Risiken an Haut bzw. Schleimhaut.

WARNUNG: Schwefelsäure reizt Augen und Haut! Nach Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.

12.1. Entsorgungshinweise

Chemikalien und Zubereitungen sind in der Regel Sonderabfälle. Deren Beseitigung unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde informiert über die Entsorgung von Sonderabfällen.

1. INTRODUCTION

La maladie de Chagas est présente en Amérique central et Amérique du sud. C'est une maladie infectieuse transmise aux humains par la piqûre provoquée par un insecte infecté de la famille des Reduviidae. L'infection est provoquée par un parasite unicellulaire Trypanosoma cruzi. L'infection traverse différentes phases et peut entraîner une maladie souvent chronique. 4 à 5 millions de personnes en Amérique du Sud sont infectés. Les personnes vivant dans de mauvaises conditions sont principalement touchées. Jusqu'à 10 % des infections sont mortelles; les bébés et les nouveau-nés présentent un risque spécifique.

L'infection est transmise aux humains par différentes espèces d'insectes de la famille des Reduviidae. Le parasite ne pénètre pas le corps humain au moment de la piqûre par l'insecte. Trypanosoma cruzi vit en fait dans les déjections d'insectes et contamine les humains au niveau des lésions cutanées. Les nouveaux-nés présentent un risque d'infection in-utéro. Une infection par l'intermédiaire de transfusion sanguine est également possible.

Environ 1-2% de toutes les personnes infectées montrent des symptômes après un temps d'incubation d'une à quatre semaines. Les enfants jusqu'à 15 ans sont principalement affectés. La maladie présente trois phases différentes.

Pendant la phase aiguë, de la fièvre, des diarrhées, des coliques, des ganglions lymphatiques gonflés et le gonflement du corps entier apparaissent. Plus particulièrement chez les nouveau-nés et les enfants en bas âge, une inflammation du cœur ou du cerveau sont possible. La phase aiguë dure environ 4 semaines. La maladie de Chagas aiguë est la plupart du temps une maladie infantines. Dans beaucoup de cas, la maladie évolue vers une guérison. La phase suivante de latence est caractérisée par l'absence de symptômes pour la plupart des patients. De temps en temps, un affaiblissement du système immunitaire est possible. Cette phase peut durer plusieurs années.

10 à 20 % des personnes infectées atteignent une phase chronique. Différents organes internes comme le cœur, la région intestinale ou le système nerveux peuvent être affectés. Les patients meurent le plus souvent soient par arrêt cardiaque soudain ou suite aux conséquences de l'insuffisance cardiaque chronique. Le pronostic dépend de la sévérité de l'atteinte cardiaque. Diverses méthodes diagnostiques a été employée, mais la détection des anticorps dirigés contre les antigènes de T. cruzi reste la méthode la plus fiable pour diagnostiquer l'infection.

2. INDICATION D'UTILISATION

La trousse Chagas (Trypanosoma cruzi) IgG ELISA de Demeditec est prévue pour la détermination qualitative des anticorps IgG anti-Trypanosoma cruzi dans le sérum ou plasma (citrates) humain.

3. PRINCIPE DU DOSAGE

La détermination immunoenzymatique qualitative des anticorps IgG anti-Chagas (Trypanosoma cruzi) est basée sur la technique ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Les puits des barrettes de microtitration sont revêtus d'antigènes du Trypanosoma cruzi pour lier les anticorps correspondants de l'échantillon. Après le lavage des puits pour éliminer l'échantillon non lié, le conjugué Protéine A marquée à la peroxydase du raifort (HRP) est ajouté. Ce conjugué se lie aux complexes antigènes-anticorps. Le complexe immun est visualisé en ajoutant le substrat de Tétraméthylbenzidine (TMB) qui donne un produit de réaction bleu. L'intensité de ce produit est proportionnelle à la quantité d'anticorps IgG spécifiques du Trypanosoma cruzi dans l'échantillon de patient. De l'acide sulfurique est ajoutée pour arrêter la réaction. Ceci produit une couleur jaune. L'absorbance à 450 nm est lue en utilisant un lecteur de microplaques ELISA.

4. MATERIEL

4.1. Réactifs fournis

Puits revêtus de la Chagas (IgG) : 12 barrettes de 8 puits sécables revêtus d'antigène du Trypanosoma cruzi; en sachets d'aluminium refermables.

Diluant pour échantillon IgG * :** 1 flacon contenant 100 ml de tampon pour la dilution de l'échantillon ; pH 7.2 ± 0.2 ; prêt à l'emploi ; couleur jaune ; bouchon blanc.

Solution d'arrêt : 1 flacon contenant 15 ml d'acide sulfurique, 0.2 mol/l ; prêt à l'emploi ; couvercle rouge.

Solution de lavage (concentrée x 20.) * : 1 flacon contenant 50 ml d'un tampon concentré 20 fois (pH 7.2 ± 0.2) pour laver les puits ; bouchon blanc.

Conjugué Protéine A ** : 1 flacon contenant 20 ml de Protéine A conjuguées à de la peroxydase du raifort ; prêt à l'emploi ; couleur bleue, bouchon noir.

Solution de substrat TMB : 1 flacon contenant 15 ml de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) ; prêt à l'emploi ; bouchon jaune.

Contrôle positif IgG Chagas* :** 1 flacon contenant 2 ml ; prêt à l'emploi ; couleur jaune ; bouchon rouge.

Contrôle seuil (cut-off) IgG Chagas* :** 1 flacon contenant 2 ml ; prêt à l'emploi ; couleur jaune ; bouchon vert.

Contrôle négatif IgG Chagas* :** 1 flacon contenant 2 ml ; prêt à l'emploi ; couleur jaune ; bouchon bleu.

* contient 0,1 % de Bronidox L après dilution

** contient 0,2 % de Bronidox L

*** contient 0,1 % de Kathon

4.2. Matériel fourni

- 1 support de plaque
- 1 couvercle autocollante
- 1 notice d'emploi
- 1 schéma de distribution et d'identification

4.3. Matériel et équipement requis

- lecteur de microplaques ELISA, pour mesurer l'absorbance à 450/620nm
- Incubateur à 37 °C
- Laveur manuel ou automatique pour le lavage des puits
- Pipettes pour utilisation entre 10 et 1000 µl
- Mélangeur Vortex
- Eau désionisée ou (récemment) distillée
- Tubes jetables
- Chronomètre

5. STABILITE ET CONSERVATION

Les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette, s'ils sont conservés entre 2 et 8 °C.

6. PREPARATION DES REACTIFS

Il est très important que tous les réactifs, échantillons et contrôles soient portés à température ambiante (20 - 25 °C) avant de commencer le dosage !

6.1. Barrettes revêtues sécables

Les barrettes sécables sont revêtues d'antigène du Trypanosoma cruzi et sont prêtes à l'emploi. Conserver à +2...+8 °C. Après avoir prélevé les barrettes nécessaires, refermer immédiatement les autres dans le sachet d'aluminium avec le déshydratant fourni et les conserver à +2...+8 °C ; elles sont stables jusqu'à la date de péremption.

6.2. Conjugué Protéine A

Le flacon contient 20 ml d'une solution de Protéine A, peroxydase du raifort, un tampon, des stabilisants, des conservateurs et un colorant bleue inerte. La solution est prête à l'emploi. Conserver à +2...+8°C. *Après la première utilisation, la solution reste stable jusqu'à la date de péremption, si elle est conservée à +2...+8°C.*

6.3. Contrôles

Les flacons de contrôle positif, contrôle seuil (cut-off) et de contrôle négatif contiennent une solution de contrôle prête à l'emploi. Elle contient 0,1% de Kathon et doit être conservée à +2...+8°C. *Après la première utilisation, la solution reste stable jusqu'à la date de péremption, si elle est conservée à +2...+8°C*

6.4. Diluant pour échantillon IgG

Le flacon contient 100 ml d'un tampon phosphaté, des stabilisants, des conservateurs et un colorant jaune inerte. Il est utilisé pour la dilution de l'échantillon du patient. Cette solution prête à l'emploi doit être conservée à +2...+8°C. *Après la première utilisation, la solution reste stable jusqu'à la date de péremption, si elle est conservée à +2...+8°C.*

6.5. Solution de lavage (conc. x 20)

Le flacon contient 50 ml d'un tampon concentré, des détergents, des stabilisants et des conservateurs. Diluer la solution de lavage au 1/20^{ème} ; par exemple 10 ml de la solution de lavage + 190 ml d'eau bidistillée récente et non contaminée. Le tampon dilué est stable 5 jours si conservé à température ambiante. Le tampon concentrée est stable jusqu'à la date de péremption, si elle est conservée à +2...+8°C. *Les cristaux dans la solution disparaissent en chauffant à 37°C dans un bain marie.*

6.6. Solution de substrat TMB

Le flacon contient 15 ml d'un mélange de peroxyde d'hydrogène et de tétraméthylbenzidine. Le réactif est prêt à l'emploi et doit être conservé à +2...+8°C, à l'abri de la lumière. *La solution devrait être incolore ou avoir une légère teinte bleue. Si le substrat devient bleu, il a pu être contaminé et devrait être remplacé. Après la première utilisation, la solution reste stable jusqu'à la date de péremption, si elle est conservée à +2...+8°C.*

6.7. Solution d'arrêt

Le flacon contient 15 ml d'une solution d'acide sulfurique 0,2 M (R 36/38, S 26). Cette solution est prête à l'emploi et doit être conservée à +2...+8°C. *Après la première utilisation, la solution reste stable jusqu'à la date de péremption, si elle est conservée à 2-8°C.*

7. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Utiliser des échantillons de sérum ou plasma (citrate) humain pour cette analyse. Si le dosage est réalisé dans les 5 jours après le prélèvement, les échantillons doivent être conservés à +2...+8°C ; autrement ils doivent être aliquotés et conservés surgelés (-20 à -70°C). Si les échantillons sont conservés congelés, bien mélanger les échantillons décongelés avant le dosage. *Éviter les cycles répétés de congélation et décongélation.*

L'inactivation par la chaleur des échantillons n'est pas recommandée.

7.1. Dilution de l'échantillon

Avant le dosage, tous les échantillons doivent être dilués au 1/101^{ème} avec le diluant pour échantillon IgG.

Diluer 10 µl d'échantillon avec 1 ml du diluant pour échantillon IgG dans des tubes pour obtenir une dilution au 1/101^{ème} et mélanger soigneusement sur un Vortex.

8. PROCEDE DE DOSAGE

8.1. Préparation du dosage

Lire attentivement la notice d'emploi **avant de** réaliser le dosage. La fiabilité des résultats dépend du suivi strict du protocole. La technique de dosage suivante a été validée uniquement pour une procédure manuelle. Si le dosage doit être effectué sur un automate, nous conseillons d'augmenter le nombre d'étapes de lavage de trois à cinq et le volume de la solution de lavage de 300 à 350 µl. Avant de commencer le dosage, déterminer, sur le formulaire fourni dans la trousse, le plan de distribution et d'identification des échantillons et des contrôles. Sélectionner le nombre de barrettes ou de puits nécessaires et les placer sur le support.

Réserver au moins :

1 puits (par exemple A1)	pour le blanc substrat,
1 puits (par exemple B1)	pour le contrôle négatif
2 puits (par exemple C1+D1)	pour le contrôle cut-off et
1 puits (par exemple E1)	pour le contrôle positif.

Il est conseillé de déterminer les contrôles et les échantillons du patient en doublets si nécessaire.

Réaliser toutes les étapes du dosage dans l'ordre donné et sans délai entre les étapes.

Un embout de pipette propre et jetable doit être utilisé pour distribuer chaque contrôle et échantillon.

Régler l'incubateur à $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

1. Pipeter 100 µl de contrôles et d'échantillons dilués dans leurs puits respectifs. Garder le puits A1 pour le blanc substrat.
2. Couvrir les puits avec le couvercle.
3. **Incuber pendant 1 heure \pm 5 minutes à $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$.**
4. A la fin de l'incubation, enlever le couvercle, aspirer le contenu des puits et laver chaque puits trois fois avec 300 µl de solution de lavage. Éviter les débordements des puits de réaction. Le temps de trempage entre chaque cycle de lavage devrait être > 5 sec. À la fin, enlever soigneusement le liquide restant en tapotant les barrettes sur du papier absorbant avant la prochaine étape !
Note : L'étape de lavage est très importante ! Un lavage insuffisant peut conduire à une précision faible et à des valeurs d'absorbance faussement élevées.
5. Pipeter 100µl du conjugué Protéine A dans tous les puits sauf le puits blanc (par exemple A1). Fermer avec le couvercle.
6. **Incuber pendant 30 minutes à température ambiante.** *Ne pas exposer à la lumière directe du soleil.*
7. Répéter l'étape numéro 4.
8. Pipeter 100 µl de la solution de substrat TMB dans tous les puits.

9. **Incuber pendant exactement 15 minutes à température ambiante dans l'obscurité.**

10. Pipeter 100 µl de la solution d'arrêt dans tous les puits dans le même ordre et à la même vitesse que pour la solution de substrat TMB.

La couleur bleue développée pendant l'incubation tourne au jaune.

Note : Des échantillons de patients fortement positifs peuvent causer des précipités foncés du chromogène ! Ces précipités peuvent influencer les valeurs mesurées de densité optique. Il est recommandé de diluer l'échantillon avec du sérum physiologique, par exemple au 1/2. Ensuite diluer l'échantillon au $1/101^{\text{ème}}$ avec le tampon et multiplier les résultats en U (units) par 2.

11. Mesurer l'absorbance de l'échantillon à 450/620nm dans les 30 minutes après l'addition de la solution d'arrêt.

8.2. Mesure

Faire le **zéro** du lecteur ELISA à l'aide du **blanc substrat dans le puits A1**.

Si - pour des raisons techniques - le lecteur d'ELISA ne peut pas être ajusté à zéro en utilisant le blanc substrat dans le puits A1, soustraire la valeur d'absorbance du puits A1 de toutes les autres valeurs d'absorbance mesurées afin d'obtenir des résultats fiables !

Mesurer l'absorbance de tous les puits à **450 nm** et enregistrer les valeurs d'absorbance pour chaque contrôle et échantillon de patient dans le plan de distribution et d'identification.

Une lecture en double longueur d'onde employant 620 nm comme longueur d'onde de référence est conseillée.

Calculer **les valeurs moyennes d'absorbance** pour tous les doublets, si nécessaire.

9. RESULTATS

9.1. Critères de validation

Afin de valider le dosage, les critères suivants doivent être respectés :

- **Blanc Substrat** dans A1 : Valeur d'absorbance < **0,100**.
- **Contrôle négatif** dans B1 : Valeur d'absorbance < **0,200 et < cut-off**
- **Contrôle seuil (cut-off)** dans C1 et D1 : Valeur d'absorbance **0,150 – 1,30**
- **Contrôle positif** dans E1 : Valeur d'absorbance >**contrôle seuil (cut-off)**.

Lorsque ces critères ne sont pas remplis, le test n'est pas valide et doit être recommencé.

9.2. Calcul des résultats

La valeur seuil correspond à la moyenne des valeurs d'absorbance du contrôle seuil (cut-off).

Exemple : $0,37 \text{ DO cont. seuil} + 0,39 \text{ DO cont. seuil} = 0,76 \div 2 = 0,38$

« Cut-off » = 0,38

9.3. Interprétation des résultats

Des échantillons sont considérés **POSITIFS** si la valeur d'absorbance est supérieure de 10% à la valeur seuil.

Des échantillons avec une valeur d'absorbance comprise entre +10% et -10% autour de la valeur « seuil » ne peuvent pas être considérés comme clairement positifs ou négatifs

→ **zone grise**

Il est conseillé de refaire le dosage 2 à 4 semaines après, avec un échantillon frais. Si les résultats du deuxième dosage sont encore dans la zone grise, l'échantillon doit être considéré **NÉGATIF**.

Des échantillons sont considérés **NÉGATIFS** si la valeur d'absorbance est inférieure de 10% à la valeur « seuil ».

9.3.1. Résultats en unités

Valeur (moyenne) d'absorbance du patient x 10 = [unités = units= U]
« seuil »

Exemple : $\frac{1,216 \times 10}{0,38} = 32 \text{ U}$

« Seuil » :	10	U
Zone grise :	9-11	U
Négatif :	< 9	U
Positif :	> 11	U

10. PERFORMANCES DU DOSAGE

10.1. Précision

<u>Inter-essais</u>	<u>n</u>	<u>moyenne</u>	<u>CV (%)</u>
Sérum neg.	4	5.7	10.2
Sérum pos.	7	13.5	7.7

<u>Intra-essai</u>	<u>n</u>	<u>moyenne</u>	<u>CV (%)</u>
Sérum pos.	15	0.61	7.8

10.2. Spécificité diagnostique

La spécificité diagnostique est définie comme la probabilité d'obtenir un résultat négatif en l'absence d'un analyte spécifique. Elle est 99 %.

10.3. Sensibilité diagnostique

La sensibilité diagnostique est définie comme la probabilité d'obtenir un résultat positif en présence d'un analyte spécifique. Elle est 99 %.

10.4. Interférences

Des sérums hémolytiques ou lipémiques ou ictériques n'ont pas montré d'interférences, avec des concentrations jusqu'à 10 mg/ml de hémoglobine, 5 mg/ml de triglycérides et 0,2 mg/ml de bilirubine.

Ces résultats s'appuient sur les groupes d'échantillons étudiés ; il n'agit pas de caractéristiques techniques garanties.

11. LIMITES DE LA TECHNIQUE

Une contamination bactérienne ou des cycles gel-dégel répétés du spécimen peuvent affecter les valeurs d'absorption. Le diagnostic d'une maladie infectieuse ne devrait pas être établi sur la base du résultat d'une seule analyse. Un diagnostic précis devrait prendre en considération l'histoire clinique, la symptomatologie ainsi que les données sérologiques.

Les données sérologiques sont de valeur limitée dans le cas des patients immunocompromis et des nouveaux-nés.

L'interaction avec Leishmania, Trypanosoma brucei rhodesiense et Trypanosoma brucei gambiense ne peut pas être exclue.

12. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- En accord avec l'article 1 paragraphe 2b de la directive européenne 98/79/EC, l'utilisation des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro est destinée par le fabricant à garantir le bien-fondé, les performances et la sécurité du produit. Par conséquent, la procédure de dosage, l'information, les précautions et mises en garde de la notice d'emploi, doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces trousse avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de dosage, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont autorisés ; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces motifs. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic in vitro.
- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été trouvés non réactifs en Ag HBs, en anticorps anti-VHI 1 et 2 et en anticorps anti-VHC. Néanmoins, tous les produits doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Ne pas échanger les réactifs ou les barrettes provenant de différents lots de production.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants avec les réactifs de cette trousse.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Utiliser seulement des embouts de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée.
- Fermer soigneusement les flacons après utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- Avant une nouvelle utilisation, vérifier les flacons de conjugué et de contrôle, déjà utilisés, pour exclure une contamination microbienne.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et le conjugué exactement au fond des puits sans éclabousser.
- Le NovaLisa™ ELISA est uniquement destiné à l'utilisation par un personnel compétent, maîtrisant parfaitement les techniques de travail.

AVERTISSEMENT : A la concentration utilisée, Bronidox L ne pose pratiquement aucun risque toxicologique en cas de contact avec la peau et les membranes muqueuses !

AVERTISSEMENT : L'acide sulfurique est irritant pour les yeux et la peau. Garder hors de la portée des enfants. En cas de contact avec les yeux, rincer soigneusement avec de l'eau et consulter un médecin !

12.1. Elimination des déchets

Les résidus des produits chimiques et des préparations sont considérés en général comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchet est réglementée par des lois et réglementations nationales et régionales. Contacter les autorités compétentes ou les sociétés de gestion des déchets pour obtenir des renseignements sur l'élimination des déchets dangereux.






BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA

SOARES, M.B.P., PONTES-DE-CARVALHO, L. AND RIBEIRO-DOS- SANTOS, R. (2001) THE PATHOGENESIS OF CHAGAS´DISEASE: WHEN AUTOIMMUNE AND PARASITE-SPECIFIC IMMUNE RESPONSES MEET. AN. ACAD. BRAS. CIENC. 73, 547-559

FERREIRA, M.S. AND BORGES, A.S. (2002) SOME ASPECTS OF PROTOZOAN INFECTIONS IN IMMUNOCOMPROMISED PATIENTS- A REVIEW. MEM. INST. OSWALDO CRUZ, RIO DE JANEIRO 97, 443-457

AÑEZ, N., CRISTANTE, G. AND ROJAS, A. (2004) UPDATE ON CHAGAS DISEASE IN VENEZUELA - A REVIEW. MEM. INST. OSWALDO CRUZ, RIO DE JANEIRO 99, 781-787

MACEDO, A.M., MACHADO, C.R., OLIVEIRA, R.P. AND PENA, S.D.J. (2004) TRYPANOSOMA CRUZI: GENETIC STRUCTURE OF POPULATIONS AND RELEVANCE OF GENETIC VARIABILITY TO THE PATHOGENESIS OF CHAGAS DISEASE. MEM. INST. OSWALDO CRUZ, RIO DE JANEIRO 99, 1-12

Symbols Key/ Symbolschlüssel/ Explication des symboles / Legenda / Símbolos	
	Manufactured by / Hergestellt von/ Fabriqué par
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device/ In Vitro Diagnosticum/ Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
LOT	Lot Number/ Chargenbezeichnung/ Numéro de lot
	Expiration Date/ Verfallsdatum/ Date de péremption
	Storage Temperature/ Lagertemperatur/ Température de conservation
CE	CE Mark/ CE-Zeichen/ Marquage CE
[REF]	Catalogue Number/ Katalog Nummer/ Référence du catalogue
	Consult Instructions for Use/ Gebrauchsanweisung beachten/ Consulter la notice d'utilisation
SORB MT	Microplate/ Mikrotiterplatte/ Microplaque
CONJ	Conjugate/ Konjugat/ Conjugué
CAL A	Control serum, negative/ Kontrollserum, negative/ Sérum de contrôle négatif
CAL B	Control serum, positive/ Kontrollserum, positiv/ Sérum de contrôle positif
CAL C	Cut off control serum/ Cut off Kontrollserum/ Sérum de contrôle du cut-off
DIL	Sample diluent buffer IgG/ IgG-Probenverdünnungspuffer/ Tampon diluant pour échantillon IgG
STOP SOLN	Stop solution/ Stopplösung/ Solution d'arrêt
SUB TMB	TMB Substrate solution/ TMB-Substratlösung/ Substrat TMB
WASH SOLN 20x	Washing solution 20x concentrated/ Waschlösung 20x konzentriert/ Solution de lavage concentré 20 x
	Contains sufficient for "n" tests/ Ausreichend für "n" Tests/ Contenu suffisant pour "n" tests/ Contenuto sufficiente per "n" saggi/ Contenido suficiente para "n" tests

SCHEME OF THE ASSAY
Chagas (Trypanosoma cruzi) IgG-ELISA

Test preparation

Prepare reagents and samples as described.
Establish the distribution and identification plan for all specimens and controls on the result sheet supplied in the kit.
Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Assay procedure

	Substrate blank (e.g. A1)	Negative control	Positive control	Cut-off control	Sample (diluted 1+100)
Negative control	-	100µl	-	-	-
Positive control	-	-	100µl	-	-
Cut-off control	-	-	-	100µl	-
Sample (diluted 1+100)	-	-	-	-	100µl
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 1 h at 37°C Wash each well three times with 300µl of washing solution					
Conjugate	-	100µl	100µl	100µl	100µl
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 30 min at room temperature Wash each well three times with 300µl of washing solution					
TMB Substrate	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark					
Stop Solution	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)					