

CHAGAS IFA IgG+IgM

Für die *In vitro* Diagnostik

PCHAG: Kit für die indirekte Antikörper-Immunfluoreszenz (IFA) zur Bestimmung von *Trypanosoma cruzi* Total-Antikörpern in humanem Serum/Plasma.

EINLEITUNG:

Die Chagas-Krankheit wird durch den Parasiten *Trypanosoma cruzi* verursacht, der auf Tiere und Menschen über Insektenvektoren (Triatominae) übertragen wird, die nur in Amerika vorkommen (hauptsächlich in ländlichen Gebieten von Lateinamerika). Personen können außerdem durch die Aufnahme von ungekochten Speisen angesteckt werden, die mit Fäkalien von infizierten Insekten verunreinigt sind oder durch kongenitale Übertragung, Bluttransfusion, Organtransplantationen oder unbeabsichtigte Exposition im Labor. Man nimmt an, dass 8 bis 11 Millionen Personen in Mexiko, Zentralamerika und Südamerika an der Chagas-Krankheit leiden, von denen die meisten aber gar nicht wissen, dass sie infiziert sind. Wird die Krankheit nicht behandelt, kann sie das ganze Leben andauern und sogar tödlich sein.

Die Chagas-Krankheit weist zwei Phasen auf: eine akute Phase und eine chronische Phase. Beide Phasen können symptomfrei verlaufen oder potenziell tödlich sein. Die akute Phase endet nach wenigen Wochen oder Monaten nach der Infektion. Normalerweise verläuft die Krankheit symptomfrei oder zeigt leichte Symptome (Fieber, Müdigkeit, Körperschmerzen, Kopfschmerzen, Hautauschlag, Appetitlosigkeit, Diarrhöe und Erbrechen). Das charakteristischste Merkmal für die akute Phase der Chagas-Krankheit ist als Romana-Zeichen bekannt, das durch eine Schwellung des Augenlides gekennzeichnet ist, das sich näher am Stich befindet. Die Symptome verschwinden im Allgemeinen nach wenigen Wochen, aber die Infektion bleibt bestehen, wenn sie nicht behandelt wird. Selten sterben junge Kinder (<5%) oder immungeschwächten Patienten an einer Infektion/Entzündung des Herzmuskels (Myocarditis) oder des Gehirns (Meningoenzephalitis). Während der chronischen Phase kann die Infektion sogar jahrzehntelang oder sogar das ganze Leben hindurch latent bleiben. In diesem Stadium entwickeln einige Personen Herzprobleme (Kardiomyopathie, Herzschwäche, Herzstillstand, Herzrhythmusstörungen) und Darmprobleme (Megaesophagus oder Megacolon).

Die Bestimmung von Antikörpern ist die wichtigste Methode für die Diagnose der Chagas-Krankheit. Die am häufigsten verwendeten Tests sind die indirekte Hämagglutination, die indirekte Immunfluoreszenz und ELISA mit ganzen oder halbgereinigten Antigenen von *T. cruzi* epimastigote. Diese Tests haben eine hohe Sensibilität und Spezifität gezeigt und können als Routinetests standardisiert werden. Der indirekte Immunfluoreszenz-Test basiert auf der Verwendung von auf Glasobjektträgern fixierten Epimastigoten von *T. cruzi*.

PRINZIP DES TESTS:

Die Methode der indirekten Immunfluoreszenz basiert auf der Reaktion der Antikörper der Probe mit dem an die Oberfläche des Objektträgers gebundenen Antigen. In der Probe vorhandene spezifische Antikörper reagieren mit dem Antigen, nicht-bindende Immunglobuline werden im Waschprozess beseitigt. Im nächsten Schritt reagiert der Antigen-Antikörper-

Komplex mit Fluorescein-markiertem Antihumanglobulin und wird durch Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht.

EIGENSCHAFTEN DES KITS:

Alle Reagenzien mit Ausnahme von PBS werden gebrauchsfertig geliefert. Die Kit-Bestandteile sind zur leichteren eindeutigen Identifizierung mit einer Nummer versehen. Im Versuchsverfahren werden die Nummern der in jedem Abschnitt zu verwendenden Reagenzien angegeben.

BESTANDTEILE DES KITS:

1 VIRCELL CHAGAS SLIDE: 10 Objektträger zu je 10 Feldern mit Epimastigote Formen von *T. cruzi*, gezüchtet in LIT-Medium. Die Stämme werden mit Formaldehyd inaktiviert und mit Aceton fixiert.

2 VIRCELL PBS: 1 Ampulle zur Zubereitung von 1 l PBS pH 7,2.

3 VIRCELL CHAGAS POSITIVE CONTROL: 200 µl positives Testserum/Plasma (enthält Natriumazid).

4 VIRCELL CHAGAS NEGATIVE CONTROL: 200 µl negative Testserum/Plasma (enthält Natriumazid).

5 VIRCELL ANTI-HUMAN IgT FITC CONJUGATE: 2 Ampullen mit 1,1 ml Fluorescein-markiertem Anti-Human-IgT-Konjugat in Phosphatpuffer mit Eiweißstabilisator, Evans-Blau und Natriumazid.

6 VIRCELL MOUNTING MEDIUM: 3 ml Eindeckmedium: gepuffertes Glycerol (enthält Natriumazid).

Bei 2-8°C lagern, Verfallsdatum überprüfen

Zusätzlich benötigte Materialien, die nicht im Kit enthalten sind:

Geeignete Präzisionspipetten.

Inkubator/temperierbares Bad.

Destilliertes Wasser.

24x60 mm großes Objektdeckglas.

Fluoreszenzmikroskop und nach Herstellerempfehlungen geeignete Filter

Feuchte Kammer

LAGERBEDINGUNGEN:

Das Kit ist bei der angegebenen Temperatur bis zum Verfallsdatum stabil. Verwenden Sie die Komponenten des Kits nicht mehr nach Ablauf des Verfalldatums. Das angegebene Verfalldatum gilt immer dann, wenn die Komponenten geschlossen bei der angegebenen Temperatur gelagert werden.

LAGERUNG DER ANGEBROCHENEN REAGENZIEN:

Reagenz	Stabilität
Rekonstituierte PBS	4 Monate bei 2-8°C, stets innerhalb des Verfalldatums
VIRCELL SLIDE	Nach dem Öffnen am gleichen Tag verwenden
Übrige Bestandteile	Datumsangabe auf Verpackung bei 2-8°C



STABILITÄT UND HANDHABUNG DER REAGENZIEN:

Alle Reagenzien zur Vermeidung mikrobiischer Verunreinigungen unter aseptischen Bedingungen verwenden. Nur zur Testdurchführung erforderliche Menge an Sorbent, Kontrollen, PBS und Konjugat benutzen. Restliche Lösung niemals in die Ampullen zurückgeben. Die PBS muss nach erfolgter Zubereitung bei 2-8°C gelagert und darf bei Trübung nicht verwendet werden.

VIRCELL, S.L. ist nicht verantwortlich für Fehler, die durch eine falsche Handhabung der Reagenzien dieses Kits verursacht wurden.

EMPFEHLUNGEN UND VORSICHTSMAßNAHMEN:

1. Einsatz ausschließlich für *in-vitro* diagnostische Zwecke. Nur für den professionellen Einsatz.
2. Nur Kit-Bestandteile verwenden. Reagenzien aus Kits unterschiedlicher Chargennummer oder von anderen Herstellern dürfen nicht verwendet werden. Nur PBS, Objektträger, Sorbent und Eindeckmedium sind zu gleichwertigen Substanzen anderer Artikelnummern und Chargen von IFA VIRCELL kompatibel. Die übrigen Bestandteile sind unter verschiedenen Kits kompatibel, wenn deren Chargennummer übereinstimmt.
3. Für jeden Testschritt neue Pipettenspitzen verwenden. Nur sauberes, vorzugsweise Einweg-Material verwenden.
4. Keine beschädigten Kits verwenden.
5. Nicht mit dem Mund pipettieren.
6. Konjugat und Kontrollen dieses Kits enthalten Material tierischen Ursprungs. Die Kontrollen enthalten zudem Substanzen humanen Ursprungs. Obwohl die Humanserum/Plasma-Kontrollen dieses Kits auf Hepatitis B Oberflächen Antigen (HBsAg), Hepatitis C Antikörper und Human Immunodeficiency Virus Antikörper getestet und für negativ befunden wurden, sollten Kontrollseren und Patientenproben als potentiell infektiös angesehen und entsprechend behandelt werden. Die Vertiefungen der Titerplatte sind mit inaktiviertem Antigen von *T. cruzi* beschichtet. Trotzdem sollten auch sie als potentiell infektiös angesehen und mit der nötigen Vorsicht behandelt werden. Gegenwärtig kann keine Methode eine vollständige Abwesenheit von infektiösen Bestandteilen versichern. Alle Materialien sollten wie potentiell infektiöse Stoffe entsorgt werden. Beachten Sie die örtlichen Bestimmungen für die Entsorgung von klinischem Material.
7. Aufgrund des Natriumazidgehalts (Konzentration <0,1%) ist der Kontakt von Konjugat, Sorbent, Eindeckmedium und Kontrollen mit Säuren und Schwermetallen zu vermeiden.
8. Aufgrund des Glycerolgehalts ist der Kontakt des Eindeckmediums mit Säuren zu vermeiden. Keinen hohen Temperaturen aussetzen.
9. Evans-Blau (Konzentration <0,1%) ist krebserregend. Haut- und Augenkontakt vermeiden. Betroffene Fläche bei Kontakt mit Wasser abwaschen und einen Arzt rufen.
10. Nur die in diesem Prospekt beschriebenen Protokolle benutzen. Entsprechen die in diesem Test eingesetzten Inkubationsintervalle oder –temperaturen nicht den Angaben, können die Ergebnisse fehlerhaft sein.
11. Die Kreuzverunreinigung durch Serum/Plasma verschiedener Patienten auf einem Objektträger kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Zur Vorbeugung erforderliche Vorkehrungen treffen.
12. Die Optik des Mikroskops, die Wartung und die Art der Lichtquelle können die Fluoreszenzqualität beeinträchtigen.

13. Reagenzien nicht länger als unbedingt erforderlich Raumtemperatur aussetzen.

14. Jeder Objektträger ist nur einmal zu benutzen. Er darf weder geteilt, noch dürfen unbenutzte Felder wiederverwendet werden.

15. Das Kit enthält Glaselemente, die bei Bruch zu Körperverletzungen führen können. Vorsichtig damit umgehen.

PROBENGEWINNUNG UND HANDHABUNG:

Das Blut muss unter aseptischen Bedingungen durch Venenpunktionstechniken von erfahrenem Personal entnommen werden. Zur Vermeidung von Probenverunreinigungen wird der Einsatz aseptischer oder steriler Techniken empfohlen.

Die Sera sind bei 2-8°C gekühlt zu lagern, wenn sie innerhalb der sieben auf die Entnahme folgenden Tage verarbeitet werden.

Verzögert sich die Verarbeitung, sind sie bei -20°C einzufrieren, wobei unnötiges Einfrieren und Auftauen vermieden werden sollte, da dies zu einer Verringerung des Immunglobulintiters und insbesondere von IgM führen könnte. Keine hyperlipämischen oder verunreinigten Sera verwenden. Partikel aufweisende Sera können durch Zentrifugieren geklärt werden.

TESTVORBEREITUNG:

Das einzige vor der Testdurchführung vorzubereitende Reagenz ist die PBS. Hierfür den Inhalt von Ampulle **2** auf 1 Liter destilliertes Wasser zugeben und bis zur vollständigen Auflösung schütteln. Nach erfolgter Zubereitung bei 2-8°C aufbewahren.

TESTDURCHFÜHRUNG:

1. Reagenzien und Objektträger vor deren Öffnung auf Raumtemperatur bringen.
2. 1/40 und 1/80 verdünnung der Sera vornehmen, hierfür 10 µl Serum/Plasma in 390 µl PBS **2** geben, mit einer Verdünnung von 1/40 beschriften. Mit 50 µl PBS (Verdünnung 1/80) doppelt verdünnen. Die Testsera **3** und **4** dürfen nicht verdünnt werden.
3. 20 µl 1/40 und 1/80 verdünnung Objektträger Zwei Mulden **1** zugeben. Ebenso mit den Positiv- und Negativ Testseren **3** und **4** verfahren.
4. 30 Minuten lang bei 37°C in feuchter Kammer inkubieren.
5. Objektträger kurz mit **1** PBS spülen (vermeiden, PBS **2** direkt auf die Felder zu schütten). Objektträger 10 Minuten lang in PBS tauchen. Leicht mit destilliertem Wasser spülen.
6. Objektträger **1** abtrocknen lassen.
7. Auf jedes Feld 20 µl Anti-Human-IgT-Lösung **5T** zugeben. (Erfordert keine Verdünnung).
8. Schritte 4, 5 und 6 wiederholen.
9. Auf jedes Feld einen kleinen Tropfen Eindeckmedium **6** zugeben und Deckglas aufsetzen.
10. So schnell wie möglich bei 400x Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop untersuchen. Andernfalls bis zur Betrachtung höchstens 24 Stunden lang bei 2-8°C dunkel lagern.
11. Falls bei diesen Screening-Verdünnungen positive Ergebnisse erhalten werden, die Sera mit Verdünnungen von bis zu 1/640 erneut untersuchen.



INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE:

Jede Charge wird einer internen Qualitätskontrolle unterzogen, bevor einer Freigabe unter Spezifikationen zugestimmt wird, die strenger als die für den Anwender sind. Die endgültigen Ergebnisse der Qualitätskontrolle jedes einzelnen Artikels sind erhältlich.

Dem Kontrollmaterial liegen als Referenz nachweislich intern geprüfte Serumplatten/Plasma zugrunde.

TEST-VALIDIERUNG FÜR ANWENDER:

Der Serumtiter/ Plasma ergibt sich aus der höchsten Verdünnung, bei der eine positive Reaktion festzustellen ist.

Positive Kontrolle: Periphere, zytoplasmatische und flagellare Fluoreszenz.

Negative Kontrolle: Rote Zellschablone.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE:

Der Titer des Serums/Plasma ergibt sich durch die maximale Verdünnung, bei der eine positive Reaktion beobachtet wird.

Die Reaktion ist positiv, wenn Periphere, zytoplasmatische und flagellare Fluoreszenz festgestellt wird

Die Reaktion ist negativ, wenn eine rote Zellschablone festgestellt wird.

Von den in der Beilage definierten Fluoreszenzmustern abweichende Ergebnisse dürfen nicht als positiv interpretiert werden.

Die Präsenz von Antikörpern bei einem Titer von 1/80 lässt auf eine Infektion schließen. Allerdings sollten die Sera bei dieser Verdünnung titriert werden.

EINSCHRÄNKUNGEN:

1. Der Kit ist für die Untersuchung von humanem Serum/Plasma.

2. Der Benutzer dieses Kits sollte die Packungsbeilage sorgfältig lesen und verstehen. Zur Erzielung zuverlässiger Ergebnisse muss streng das Protokoll befolgt werden. Dies bezieht sich insbesondere auf die richtige Pipettierung von Proben und Reagenzien, Waschen und Inkubationszeiten.

3. Die Probenergebnisse sind in Verbindung mit klinischer Beurteilung und sonstigen Diagnoseverfahren zu bewerten.

4. Dieser Test zeigt nicht den Infektionsort. Er kann eine Erregerisolierung nicht ersetzen.

5. Wenn kein signifikantes Ansteigen des Antikörper-Niveaus vorhanden ist, bedeutet dies nicht, dass eine Infektion ausgeschlossen werden kann.

6. Sehr früh im Verlauf einer Infektion genommene Proben können eventuell keine erkennbaren IgG-Anteile enthalten. In diesen Fällen wird die Durchführung eines Versuchs zur IgM-Bestimmung oder eine zweite Probennahme nach Ablauf von 14 bis 21 Tagen empfohlen, die dann zur Bestimmung einer Serokonversion parallel zur Originalprobe zu testen ist.

7. Bei der Erkennung von IgG bei Neugeborenen erzielte Ergebnisse sind mit Vorsicht zu interpretieren, da Mutter-IgG vor der Geburt passiv von der Mutter auf den Fetus übertragen wird. Bei Kindern unter sechs Monaten ist die IgM-Bestimmung der bessere Infektionsindikator.

8. Für die Diagnose einer Infektion sollten niemals nur die Ergebnisse der Antikörperbestimmung einer einzigen Probe herangezogen werden. Eine paarweise Testung der Proben (akut und latent) sollte erfolgen, um eine Serokonversion oder einen signifikanten Titeranstieg nachzuweisen.

9. Bei der Chagas-Krankheit kann eine starke Immunantwort durch indirekte Immunofluoreszenz bestimmt werden. In endemischen Bereichen kann es zu Kreuzreaktionen mit *Leishmania infantum* kommen, weshalb die Ergebnisse durch alternative Techniken bestätigt werden sollten.

10. Bei Patienten mit antinukleären Antikörpern kann ein Fluoreszenzmuster auf dem Kinetoplast und dem Kern auftreten, das nicht als spezifisch oder indikativ für eine Krankheit betrachtet werden darf.

11. Die angegebenen Testergebnisse entsprechen komparativen Studien mit kommerziellen prädikativen Produkten in einer definierten Bevölkerungsstichprobe. Es können kleine Unterschiede zwischen verschiedenen Bevölkerungen oder verschiedenen prädikativen Produkten bestehen.

LEISTUNGSDATEN:**• SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT:****TEST 1:**

107 Serumproben/Plasma wurden vergleichsweise mit CHAGAS IFA IgG+IgM gegenüber einem kommerzielles ELISA-Set, Die Ergebnisse lauteten wie folgt:

	Probe NR	Sensitivität	Spezifität
IgG+IgM	107	100%	98,6%

Unbestimmte Werte wurden aus den Endberechnungen gelöscht.

TEST 2 :

71 Serumproben/Plasma wurden vergleichsweise mit CHAGAS IFA IgG+IgM gegenüber einem kommerzielles ELISA-Set, Die Ergebnisse lauteten wie folgt:

	Probe NR	Sensitivität	Spezifität
IgG+IgM	71	100%	100%

Unbestimmte Werte wurden aus den Endberechnungen gelöscht.

• INTRA-ASSAY GENAUIGKEIT:

Es wurde 3 (2 positive und 1 negatives) Sera titriert und unter gleichen Arbeitsbedingungen einzeln in Fünfergruppen in einem einzigen von der gleichen Person durchgeführten Versuch pipettiert.

In keinem Fall waren Schwankungen über 1 Titer festzustellen.

• INTER-ASSAY GENAUIGKEIT:

Es wurden 3 (2 positive und 1 negatives) Sera titriert und einzeln unter 5 verschiedenen Bedingungen pipettiert, bei denen sich die Person oder der Durchführungstag änderten.

In keinem Fall waren Schwankungen über 1 Titer festzustellen.









• KREUZREAKTIVITÄT UND INTERFERENZEN:

22 Proben, die positiv auf *Leishmania* reagieren, wurden auf IgG+IgM getestet.

Die getesteten Proben ergaben negative Ergebnisse und bewiesen dabei die spezifische Reaktion des Versuchs ohne von den beschriebenen Stoffen verursachte Kreuzreaktion oder Interferenzen.



BENUTZTE ETIKETTEN-SYMBOLLE:

	Für die <i>In vitro</i> Diagnostik
	Verwendbar bis (Verfallsdatum)
	Bei x-y°C lagern
	Inhalt ausreichend für <n> Bestimmungen
	Chargen-Nummer
	Bestell-Nummer
	Gebrauchsanleitung beachten
	<X> Vertiefungen

LITERATUR:

1. Camargo, M. E. 1966. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 8:227-35.
2. Camargo, M. E. and C. Rebonato. 1969. Cross-reactivity in fluorescence tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. A simple inhibition procedure to ensure specific results. Am J Trop Med Hyg 18:500-5.

3. Carvalho, M. R., M. A. Krieger, E. Almeida, W. Oelemann, M. A. Shikanai-Yassuda, A. W. Ferreira, J. B. Pereira, A. Saez-Alquezar, P. E. Dorlhiac-Llacer, and D. F. Chamone. 1993. Chagas' disease diagnosis: evaluation of several tests in blood bank screening. Transfusion 33:830-4.
4. CDC. Chagas Disease: Fact Sheet. . Infectious Disease Information by the National Center for Infectious Diseases, CDC. (<http://www.cdc.gov/ncidod/>).
5. Guhl, F. and S. Nicholls. 2001. Manual de procedimientos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. 98 pp. Universidad de Los Andes, Santafé de Bogotá.
6. Kagan, I. G. 1980. Serodiagnosis of parasitic diseases. p. 573-604. In Rose, N. R., and H. Friedman (eds.), Manual of Clinical Immunology, 2nd ed. ASM, Washington.
7. Leiby, D. A., S. Wendel, D. T. Takaoka, R. M. Fachini, L. C. Oliveira, and M. A. Tibbals. 2000. Serologic testing for *Trypanosoma cruzi*: comparison of radioimmunoprecipitation assay with commercially available indirect immunofluorescence assay, indirect hemagglutination assay, and enzyme-linked immunosorbent assay kits. J Clin Microbiol 38:639-42.
8. Leitchuk, R., A. P. Dalmasso, C. L. Inglesini, M. Alvarez, and J. A. Cerisola. 1970. Immunoglobulin studies in serum of patients with American trypanosomiasis (Chagas' disease). Clin Exp Immunol 6:547-55.

Bei Fragen wenden Sie sich bitte an:

customerservice@vircell.com

ÜBERPRÜFT: 2017/04

