



Chagatest

HAI

Prueba de hemaglutinación indirecta para la detección de anticuerpos contra el *Trypanosoma cruzi*

SIGNIFICACION CLINICA

La enfermedad de Chagas es una infección parasitaria producida por el *Trypanosoma cruzi*. El diagnóstico de laboratorio depende del estadio en el cual se encuentre la enfermedad. Durante la fase aguda, el diagnóstico se efectúa directamente mediante la comprobación de los parásitos en sangre o por métodos inmunológicos que detecten anticuerpos específicos.

Durante la fase crónica, se pueden usar métodos inmunológicos como la reacción de aglutinación de látex, hemaglutinación, aglutinación directa, inmunofluorescencia y últimamente ELISA.

FUNDAMENTOS DEL METODO

La hemaglutinación indirecta (HAI), también llamada hemaglutinación reversa pasiva, se basa en la propiedad que tienen los anticuerpos (que en este caso son anti-T. cruzi) de producir aglutinación específica en presencia de glóbulos rojos sensibilizados con los correspondientes antígenos. En el suero existen anticuerpos inespecíficos (heterófilos) que son capaces de aglutinar glóbulos rojos de distintas especies. Su presencia se investiga enfrentando el suero con GR no sensibilizados. Los anticuerpos interferentes se eliminan mediante tratamiento con 2-mercaptoetanol.

REACTIVOS PROVISTOS

Reconstituyente HAI: solución fisiológica tamponada a pH 7.

Antígeno HAI: liofilizado de glóbulos rojos de carnero sensibilizados con antígenos citoplasmáticos de T. cruzi.

GR no sensibilizados: suspensión al 1% de eritrocitos de carnero no sensibilizados, para control de heterofilia.

Buffer HAI: solución fisiológica tamponada con fosfatos a pH 7,5, con colorante inerte.

Solución Proteica: solución de albúmina bovina al 10%.

2-Mercaptoetanol: ampolla con 2-mercaptoetanol (2-ME).

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

Control Negativo: suero no reactivo, inactivado.

REACTIVOS NO PROVISTOS

Solución fisiológica.

INSTRUCCIONES PARA SU USO

Antígeno HAI: preparar con 6,1 ml de Reconstituyente HAI. Esperar una hora antes de usar mezclando cada 20 minutos para permitir una correcta rehidratación del reactivo. Cada vez que se emplee, homogeneizar mediante agitación evitando la formación de espuma.

GR no sensibilizados: homogeneizar mediante agitación antes de usar, evitando la formación de espuma.

Diluyente de Sueros HAI: agregar 0,2 ml de Solución Proteica cada 10 ml de Buffer HAI. Mezclar, rotular y fechar.

2-Mercaptoetanol: una vez abierta la ampolla, trasvasar el contenido al frasco vacío provisto, el que se deberá tapar inmediatamente después de usar.

2-Mercaptoetanol al 1%: con el 2-ME provisto, preparar una dilución 1/100 con solución fisiológica en cantidad suficiente de acuerdo al número de pocillos que se utilicen. Ejemplo: para 96 pocillos: 25 ul de 2-ME en 2,5 ml de solución fisiológica.

Controles Positivo y Negativo: listos para usar.

PRECAUCIONES

- Los Reactivos Provistos son para uso diagnóstico "in vitro".
- Las muestras deben manipularse como si fueran capaces de transmitir la infección.
- Los sueros controles han sido examinados para antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg) y virus de inmunodeficiencia humana (HIV) encontrándose no reactivos. Sin embargo deben emplearse como si se tratara de material infeccioso.
- Todos los materiales empleados en el ensayo deben ser destruidos a fin de asegurar la inactivación de agentes patógenos. El método recomendado por este procedimiento es autoclavar durante 1 hora a 121°C. Los líquidos de desecho pueden ser desinfectados con hipoclorito de sodio (concentración final 5%) durante por lo menos 60 minutos.
- No intercambiar reactivos de distintos equipos y lotes.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE

ALMACENAMIENTO

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

Diluyente de Sueros HAI: es estable en refrigerador (2-10°C) 5 días a partir de la fecha de su preparación.

2-Mercaptoetanol al 1%: usar inmediatamente después de preparado.

Antígeno HAI: una vez reconstituido es estable durante 2 meses conservado en refrigerador (2-10°C). No congelar.

INDICIOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

- Cuando todas las diluciones de sueros son reactivas, puede ser indicio de autoaglutinación del Antígeno HAI. Verificar destinando un pocillo de la policubeta para mezclar Antígeno HAI y Diluyente de Sueros HAI, sin la Muestra. Si aún en este caso se observa aglutinación, el reactivo

estará deteriorado. Desechar.

- La ausencia de reactividad en todas las diluciones de sueros, puede ser indicio de deterioro de los reactivos. Procesar Muestra con positividad conocida.

MUESTRA

Suero

a) Recolección: el paciente debe estar preferentemente en ayunas. Obtener suero de la manera usual. No usar plasma.

b) Aditivos: no se requieren. No agregar conservadores.

c) Sustancias interferentes conocidas: hemólisis o hiperlipemia (con quilomicronemia) producen resultados erróneos.

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: el suero debe ser preferentemente fresco. En caso de no procesarse en el momento, puede conservarse en el refrigerador (2-10°C) durante no más de 72 hs contadas a partir del momento de la extracción. Para periodos más prolongados de conservación, congelar (a -20°C), evitando reiterar tal procedimiento. Los sueros envejecidos tienden a gelificarse al contacto con el 2-ME, provocando resultados falsos positivos.

MATERIAL REQUERIDO

1- Provisto

- 1 frasco vacío (para trasvasar el 2-ME de la ampolla)
- 5 policubetas con 96 pocillos de fondo en U
- Accesorios

2- No provisto

- microdilutores (25 ul) o micropipetas automáticas (25 ul)
- microgoteros (25 ul)
- tubos de ensayo y material volumétrico adecuado
- cinta adhesiva
- papel de filtro

RECOMENDACIONES PREVIAS

Microdilutores

- Acondicionamiento previo: antes de usar los microdilutores, sumergirlos en un recipiente con agua destilada y apoyar los sobre papel de filtro para asegurar una correcta toma de la muestra.
- Lavado: antes de tomar una nueva muestra con los microdilutores, descargar el volumen residual sobre papel de filtro. Luego pasarlos sucesivamente por dos recipientes con agua destilada y apoyarlos sobre papel de filtro.

Policubeta

Para eliminar la carga electrostática es necesario pasar un trapo húmedo por la base de la misma.

PROCEDIMIENTO

Seleccionar una policubeta con pocillos sin usar de fondo en U.

I- TITULACION SIN 2-ME

- 1- Con microgotero de 25 ul, colocar una gota de Diluyente de Sueros HAI en todos los pocillos a usar de la policubeta.
- 2- Tomar una alícuota de cada suero a ensayar con microdilutores de 25 ul (uno para cada muestra). Colocar

cada microdilutor en el primer pocillo y rotarlo por lo menos 10 veces para asegurar una correcta dilución de la muestra.

3- Realizar diluciones seriadas a partir del primer pocillo (dilución 1/2), pasando los microdilutores al pocillo siguiente (dilución 1/4) y así sucesivamente hasta la dilución que se desea investigar (por ejemplo: 1/8, 1/16, 1/32), rotando en cada paso el microdilutor por lo menos 10 veces para asegurar una correcta dilución de la muestra. Si se emplea una micropipeta automática de 25 ul para la toma y/o dilución de la muestra, homogeneizar por carga y descarga. Transferir 25 ul de pocillo a pocillo hasta la dilución que se desee investigar. Descartar los últimos 25 ul.

4- Colocar en los pocillos conteniendo las diluciones 1/2 y 1/4, una gota (25 ul) de GR no sensibilizados para control de heterofilia.

5- En el resto de los pocillos, agregar una gota (25 ul) de Antígeno HAI.

6- Mezclar aplicando suaves golpes en los laterales de la policubeta.

7- Dejar en reposo, a resguardo de vibraciones, durante 90 minutos.

8- Leer a partir de los 90 minutos.

Se puede aumentar la nitidez de la apreciación, leyendo sobre un espejo, iluminando la placa desde arriba e interponiendo un papel blanco y traslúcido entre la policubeta y la fuente de luz.

II- TITULACION CON 2-ME

1- Colocar una gota de suero en el primer pocillo empleando goteros plásticos descartables, manteniéndolos en posición vertical (uno por cada suero).

2- Diluir al 1/2 agregando una gota de 2-Mercaptoetanol al 1% a los mismos pocillos (utilizar un único gotero descartable).

3- Sellar estos pocillos con cinta adhesiva y mezclar aplicando suaves golpes en los laterales de la policubeta.

4- Incubar 30-60 minutos a 37°C o 90 minutos a temperatura ambiente.

5- Retirar la cinta adhesiva, pasar un trapo húmedo por la base de la policubeta y, con microgotero de 25 ul, colocar una gota de Diluyente de Sueros HAI en los restantes pocillos a utilizar hasta la dilución deseada.

6- Realizar los pasos 3 a 8 descriptos en la Titulación I.

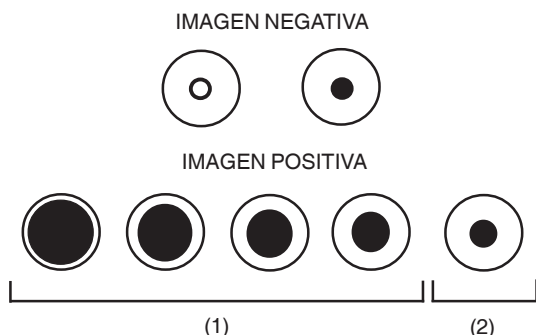
III- ABSORCION CON GLOBULOS ROJOS NO SENSIBILIZADOS

En sueros que presenten heterofilia los anticuerpos heterófilos pueden adsorberse sobre GR no sensibilizados de la siguiente forma: en un tubo de hemólisis colocar 50 ul de GR no sensibilizados provistos + 50 ul de suero en ensayo. Tapar para evitar la evaporación. Dejar la suspensión durante 30 minutos a 37°C agitando extemporáneamente. Luego centrifugar a 2000 rpm durante 5 minutos. Del sobrenadante se toman 50 ul y se emplea como dilución 1/2, colocándola en el primer pocillo. Si se emplea en titulación con 2-ME este pocillo corresponde a dilución 1/4.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

No reactivo: presencia de un sedimento en forma de botón o pequeño anillo de bordes regulares.

Reactivo: formación de una película o manto que cubre el 50% o más del fondo de los pocillos. Si no se usan microdilutores, la imagen del manto puede ser más pequeña.



(1) Manto.

(2) Punto final (50%).

TECNICA SCREENING O DESCARTE POR 1 TITULO

PROCEDIMIENTO

1- Con microgotero de 25 ul, colocar una gota de Diluyente de Sueros HAI en todos los pocillos a utilizar de la policubeta (un pocillo por cada muestra).

2- Sumergir un ansa limpia (provista) en la muestra.

3- Colocar el ansa cargada en el pocillo que contiene el Diluyente de Sueros HAI, rotando la misma para obtener un buen mezclado y distribuir la gota sobre todo el fondo del pocillo. Retirar el ansa y secarla con papel de filtro, lavar en dos recipientes con agua destilada. Secar nuevamente con papel de filtro. Proceder de la misma manera para cada nueva muestra.

4- Agregar con microgotero de 25 ul, una gota de Antígeno HAI reconstituido y homogeneizado a cada pocillo.

5- Agitar la policubeta golpeando con los dedos en las paredes laterales, durante 30 segundos por lo menos, para asegurar un buen mezclado.

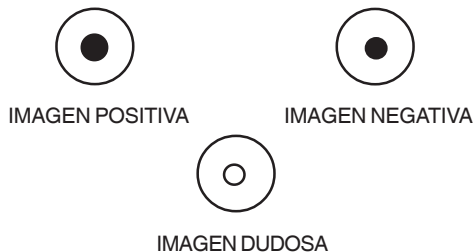
6- Dejar reposar, al resguardo de vibraciones durante 2 horas.

7- Efectuar la lectura. En caso de que la lectura de los resultados se efectúe en un plazo mayor de 2 horas, la policubeta deberá taparse con una cinta adhesiva transparente para evitar evaporaciones.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

No reactivo: presencia de un sedimento en forma de botón.

Reactivo: formación de una película o manto en el fondo de los pocillos. En caso de observar la presencia de un pequeño anillo de bordes regulares, la muestra se considerará dudosa y deberá ser ensayada por otro método.



VALORES DE REFERENCIA

Dentro de las técnicas inmunológicas, la HAI es considerada un método confiable para la determinación de anticuerpos específicos. No obstante sus resultados, al igual que los de cualquier método serológico, sólo constituyen un dato auxiliar para el diagnóstico. Es por esta razón que los informes deben ser considerados en términos de probabilidad. En este caso, mayor o menor probabilidad de parasitosis por *T. cruzi*.

Cualquier resultado Reactivo debe ser verificado por otra técnica. Recordar el criterio recomendado por el Instituto Fatała Chaben, según el cual el inmunodiagnóstico de la infección deberá hacerse con un mínimo de dos de los siguientes métodos: inmunofluorescencia indirecta, hemaglutinación indirecta, ELISA, aglutinación de partículas (látex), debidamente validados por el Centro Nacional de Referencia.

Procedimiento de titulación

Sueros con títulos mayores o iguales a 1/16, se consideran reactivos para anticuerpos anti-*T. cruzi*.

Cuando se observan resultados positivos (sueros reactivos) y además se presenta manto en los pocillos destinados a control de heterofilia (diluciones 1/2 y 1/4), debe realizarse otra titulación con los sueros correspondientes pero previamente tratados con 2-ME o adsorbidos con GR no sensibilizados. El propósito de estos tratamientos es eliminar la reacción inespecífica. En el primer caso el agente reductor (2-ME) elimina la capacidad aglutinante de los anticuerpos heterófilos, mientras que los GR no sensibilizados los elimina por adsorción.

Técnica de screening o descarte por 1 título

En las condiciones del ensayo, sueros con títulos mayores o iguales a 1/12, se consideran reactivos para anticuerpos anti-*T. cruzi*. La imagen que presenta un suero reactivo es de película o manto en el fondo del pocillo.

CONTROL DE CALIDAD

Como punto de referencia de la reacción, pueden procesarse simultáneamente un Control Positivo y un Control Negativo utilizándolos de la misma manera que la muestra.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA.

Otras causas de resultados erróneos son:

- Falta de acondicionamiento de la policubeta y los microdilutores (Ver RECOMENDACIONES PREVIAS).
- Policubetas rayadas por uso reiterado. No se aconseja reutilizar pocillos.
- Falta de homogeneización de los reactivos antes de su uso.
- Deficiencias de mezclado.

- Vibraciones accidentales durante el reposo necesario para el desarrollo de la reacción.
- Sueros envejecidos o congelados y descongelados repetidamente.
- Contaminaciones accidentales de los reactivos o del material empleado en el ensayo.
- Exceso o defecto de Diluyente de Sueros HAI en los pocillos de la policubeta.
- Diluyente de Sueros HAI que tenga más de 5 días de preparación.
- No respetar los tiempos y temperaturas de incubación en el tratamiento con 2-ME al 1%.
- 2-Mercaptoetanol al 1% no preparado en el momento.

PERFORMANCE

Trabajos experimentales realizados sobre muestras poblacionales endémicas y no endémicas, mostraron que:

- 1) En poblaciones endémicas, empleando el método de HAI, el 98% de los títulos menores a 1/8 y el 95% de los títulos mayores o iguales a 1/8 fueron confirmados por los métodos tomados como referencia.
- 2) En poblaciones no endémicas, el 100% de los individuos sanos presentó títulos menores a 1/8 determinados por HAI.
- 3) En el 100% de los individuos con serología positiva confirmada por los métodos tomados como referencia y con parasitosis demostrada por xenodiagnóstico y/o hemocultivo, se observaron títulos mayores o iguales a 1/32 determinados con Chagatest HAI.

PRESENTACION

- 96 determinaciones de 5 títulos o 480 de un título (Cód. 1293205)






















BIBLIOGRAFIA

- Mazza, S. - VI Congreso Nacional de Medicina (Córdoba), pág. 155 (1938).
- Cerisola, J.A. - La Prensa Médica Argentina 49/34:1761 (1962).
- Fontenla S., Moretti, E. y González, G. - 50° Triduo de la ABA, Huerta Grande (Córdoba), 1985.
- Basso, A. y col. - 50° Triduo de la ABA. Huerta Grande (Córdoba), 1985.
- Lorenzo, L.; Capriotti, G.; Rojkin, F. - Rev. Arg. Transf. XVII/ 1: 51, 1991.
- Ministerio de Salud y Acción Social, Instituto Nacional de Parasitología "Doctor Mario Fatała Chabén" - Normas para el diagnóstico de la infección chagásica - Resolución ministerial 523/97, 1998.

EXPLICACION DE LOS SIMBOLOS

Antígeno HAI	Buffer HAI
Antígeno HAI	Buffer HAI
Reconstituy. HAI	GR no sensibil.
Reconstituyente HAI	GR no sensibilizados
Sol. Proteica	2-ME
Solución Proteica	2-Mercaptoetanol
Control +	Control -
Control Positivo	Control Negativo

Los siguientes símbolos se utilizan en todos los kits de reactivos para diagnóstico de Wiener lab.

	Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro"
	Representante autorizado en la Comunidad Europea
	Uso diagnóstico "in vitro"
	Contenido suficiente para <n> ensayos
	Fecha de caducidad
	Límite de temperatura (conservar a)
	No congelar
	Riesgo biológico
	Volumen después de la reconstitución
	Contenido
	Número de lote
	Elaborado por:
	Nocivo
	Corrosivo / Caústico
	Irritante
	Consultar instrucciones de uso
	Calibrador
	Control
	Control Positivo
	Control Negativo
	Número de catálogo

Wiener Laboratorios S.A.I.C.
Riobamba 2944
2000 - Rosario - Argentina
<http://www.wiener-lab.com.ar>
Dir. Téc.: Viviana E. Cétola
Bioquímica
Producto Autorizado A.N.M.A.T.
Disp. N°: 1280/88 3403/95-6862/01



Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina