

HAI CHAGAS

P O L Y C H A C O

**Prueba de Hemaglutinación Indirecta para la
detección de anticuerpos contra el Trypanosoma cruzi**

Uso "In Vitro"
480 determinaciones a un título o
96 determinaciones a cinco títulos

FUNDAMENTO

HAI CHAGAS POLYCHACO consiste en una suspensión estabilizada de hematíes de carnero sensibilizados con antígeno de Trypanosoma cruzi, los cuales se aglutinan en presencia de diluciones de sueros humanos o de animales que contengan anticuerpos específicos.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL ENSAYO

Los anticuerpos específicos contra Trypanosoma cruzi, presumiblemente presentes en el suero en estudio, aglutinan al antígeno fijado sobre la superficie de los glóbulos rojos estabilizados, los cuales sedimentan formando un manto en el fondo del pocillo de la microplaca.

En los sueros de muchas personas no parasitadas se encuentran globulinas capaces de aglutinar inespecíficamente partículas antigénicas de diferente origen, incluyendo hematíes sensibilizados o no. Estas globulinas, a las que pertenecen, entre otras, los anticuerpos inespecíficos o heterófilos, la Proteína C Reactiva, etc., están presentes con títulos bajos en una proporción significativa de la población, pudiendo aumentar durante el embarazo y en numerosos procesos infecciosos o inflamatorios.

La heterofilia es detectada estudiando cada suero en la dilución 1/2 y 1/4 con hematíes no sensibilizados.

Con el uso de adsorbentes especiales en el Diluyente de Muestras la heterofilia es poco frecuente, pero en caso de observarse, puede repetirse el suero

tratándolo con 2-ME (2- Mercaptoetanol), solicitando dicho reactivo a nuestro laboratorio. Este agente reductor elimina la capacidad aglutinante de los anticuerpos heterófilos.

REACTIVOS Y MATERIALES PROVISTOS

Frasco N° 1: Antígeno. 12 ml de suspensión estabilizada de hematíes de carnero sensibilizados con antígeno de Trypanosoma cruzi. Agitar intensamente antes de usar.

Frasco N° 2: Diluyente de Muestras. 30 ml de solución salina isotónica con adsorbentes y conservadores.

Frasco N° 3: Solución Proteica. 1,5 ml de solución proteica estabilizada, con conservadores.

Frasco N° 4: Hematíes No Sensibilizados. 5 ml de suspensión estabilizada de hematíes de carnero no sensibilizados. Para control de heterofilia. Agitar intensamente antes de usar.

Frasco N° 5: Control Positivo. 0,5 ml de una dilución de suero reactivo para anticuerpos contra T.cruzi, titulado, inactivado, con conservadores. Material potencialmente infeccioso. Listo para usar.

Frasco N° 6: Control Negativo. 0,5 ml de una dilución de suero no reactivo para anticuerpos contra T.cruzi, inactivado, con conservadores. Material potencialmente infeccioso. Listo para usar.

5 Policubetas descartables, cada una con 96 pocillos con fondo en "U".

REACTIVOS Y MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS CON EL EQUIPO

- Microgoteros de 25 μ l
- Micropipetas o microdiluidores de 25 μ l
- Pipetas de 5 y 1 ml
- Espejo para lectura de policubetas o fondo blanco
- Papel de filtro
- Recipiente para sumergir los microdiluidores
- Agua destilada o desionizada
- Solución fisiológica para uso en el tratamiento con 2-ME.

ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

Los reactivos son estables hasta la fecha que figura en la caja y frascos. Guardar los componentes del equipo preferentemente entre 2 y 8 °C, siempre en posición vertical. **No congelar.**

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Solamente para uso diagnóstico "In Vitro".
- Las muestras de sueros humanos y los controles deben ser considerados como potenciales portadores de agentes infecciosos, por lo que se recomienda respetar las condiciones de bioseguridad en su manipulación.
- Todo material utilizado en la reacción debe ser considerado contaminado, debiendo ser inactivado con hipoclorito de sodio al 5% durante 30 minutos, ó autoclavado durante por lo menos 1 hora a 121,5°C.
- Defectos en el volumen de dispensado del Control Positivo ocasionados por su alta viscosidad, puede dar títulos inferiores al declarado. Por eso es necesario extremar las precauciones en su manipulación.
- No utilizar el equipo después de la fecha de vencimiento.
- No mezclar reactivos de lotes diferentes.
- Verificar que el volumen de las micropipetas o microdiluidores sea el correcto.
- **No congelar el equipo**, pues los glóbulos se autoaglutinan (formación de partículas sólidas macroscópicas). Si esto ocurre, debe descartarlo.
- Si el suero fue tratado con 2-ME verificar que el mismo no se encuentre gelificado, finalizada la incubación post tratamiento. Si gelifica, tratarlo nuevamente realizando una dilución previa 1/2 con Solución fisiológica. Sueros hiperlipémicos gelifican con más facilidad en el tratamiento con 2-ME.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Antígeno (frasco N° 1): agitar enérgicamente el frasco antes de usar, hasta obtener una suspensión homogénea. Mantener el frasco en posición vertical.

Diluyente de Muestras (frasco N° 2): antes de utilizar el Diluyente, agregar 0,5 ml de Solución Proteica (frasco N° 3), cada 10 ml de Diluyente. Preparar la cantidad necesaria para el uso inmediato, ya que solo es estable durante dos días si se mantiene entre 2 y 8 °C.

Hematías No Sensibilizadas (frasco N° 4): agitar enérgicamente el frasco antes de usar, hasta obtener una suspensión homogénea. Mantener el frasco en posición vertical.

Control Positivo y Negativo (frascos N° 5 y 6): listos para usar. Estos controles se preparan a partir de suero humano no reactivo para anticuerpos contra HCV, HIV y HBsAg, adecuadamente inactivado. Sin embargo, todos los derivados de la sangre humana deben manejarse con precaución.

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Emplear suero fresco y límpido. La sangre se extraerá de un paciente preferentemente en ayunas siguiendo las normas generales, recogiéndola

en tubos de centrifuga. Para obtener el suero dejar coagular la sangre, centrifugar y separar el sobrenadante.

Los sueros pueden ser conservados entre 2 y 8 °C hasta 48 horas, o congelados a -20 °C para un almacenamiento prolongado.

Deben evitarse los congelamientos/descongelamientos repetidos.

PROCEDIMIENTO

1. Colocar 25 µl de Diluyente de Muestras (ver Preparación de los Reactivos) utilizando un microgotero o una micropipeta calibrada, a partir del primer pocillo de una policubeta descartable. Utilizar la cantidad de pocillos necesarios hasta la dilución (título) que se desee investigar.
2. Tomar un microdiluidor de 25 µl y sumergirlo en un recipiente con agua destilada o desionizada, secarlo con papel de filtro por rotación y seguidamente colocarlo en el suero a analizar. Al retirarlo controlar que la muestra cubra la totalidad de los espacios vacíos.
3. Sumergir el microdiluidor cargado en el 1º pocillo y girar el mismo entre ambas manos no menos de 10 veces. Esta operación asegurará una perfecta homogeneización de la muestra.
4. Transferir los microdiluidores a la fila siguiente y repetir la misma operación hasta la dilución deseada.
5. Retirar los microdiluidores y secarlos con papel de filtro. Sumergirlos sucesivamente en dos recipientes con agua destilada o desionizada y secarlos con papel de filtro para usarlos nuevamente.
6. Repita los pasos 2 a 5 con el Control Positivo (ver Advertencias y Precauciones) y el Control Negativo provistos en el equipo.
7. Si utiliza la micropipeta de 25 µl para la toma y dilución de la muestra y los controles, homogeneizar por carga y descarga, transfiriendo 25 µl de pocillo en pocillo hasta la dilución deseada, descartando los últimos 25 µl.
8. Depositar 25 µl de Hematías No Sensibilizados (frasco N° 4) en los pocillos 1 y 2 (dilución 1/2 y 1/4) solamente del suero. No colocar en las diluciones de los Controles Positivo y Negativo.
9. Depositar 25 µl de Antígeno (frasco N° 1) en los restantes pocillos. (Dilución 1/8 hasta la dilución a investigar).
10. Agitar la policubeta golpeando con los dedos sobre sus paredes laterales, durante no menos de 30 segundos.
11. Dejar la policubeta en reposo a resguardo de vibraciones durante un mínimo de dos horas y leer.

Esquema del procedimiento

Diluyente de Muestras (0,5 ml de Solución Proteica por cada 10 ml de Diluyente de Muestras).	25 µl desde los pocillos 1 hasta los pocillos con la dilución que desee investigar.
Suero y/o Control Positivo y/o Control Negativo.	25 µl en los pocillos 1
Homogeneizar y transferir 25 µl desde el primer pocillo hasta el pocillo con la dilución que se desee investigar, despreciando los últimos 25 µl.	
Hematías No Sensibilizados	25 µl en los pocillos 1 y 2 del SUERO solamente. No colocar en los Controles Positivo y Negativo.
Antígeno	25 µl a partir de los pocillos 3 en adelante.
Agite manualmente la policubeta durante 30 segundos	
Dejar la policubeta en reposo 2 horas y leer	

Tabla de dilución

Pocillo	Dilución	Título
1	1/2	2
2	1/4	4
3	1/8	8
4	1/16	16
etc.	etc.	etc.

Procedimiento con 2-Mercaptoetanol

Si fuera necesario tratar los sueros con 2-ME proceder de la siguiente manera:

1. Preparar una solución de 2-ME 1/100 en Solución fisiológica. Utilizar esta solución solamente el día de su preparación.
2. En un recipiente adecuado colocar iguales volúmenes de suero y de 2-ME 1/100 preparado anteriormente. Tapar el recipiente.
3. Incubar durante 30 minutos a 37 °C ó 120 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C). Verificar ausencia de gelificación post incubación. (Ver Advertencias y Precauciones).
4. Titular según el procedimiento habitual, teniendo en cuenta que en este caso el pocillo 1 corresponde a la dilución 1/4. (Título 4).

LECTURA

Luego de transcurridas dos horas, proceder a la lectura en espejo para policubetas o sobre un fondo blanco.

REACCIÓN POSITIVA: formación de un manto en el fondo del pocillo por aglutinación del antígeno, que debe ocupar más del 50% del mismo.

REACCIÓN NEGATIVA: formación de un botón nítido o botón con centro de luz, de bordes regulares, por sedimentación del antígeno.

CRITERIO DE ACEPTABILIDAD DEL ENSAYO

La inclusión de un Control Positivo y Negativo permite verificar la reproductibilidad del ensayo, la estabilidad de los reactivos y llamar la atención sobre posibles errores de técnica.

El título del Control Positivo se indica en su correspondiente etiqueta y no debe variar más de un orden de dilución (+ 1 título) durante el tiempo que dure el equipo. (Ver Advertencias y Precauciones).

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El título del suero será la inversa de la dilución que da lugar a un manto que ocupe 50% o más del pocillo.

El 98% de los sueros provenientes de una población serológicamente reactiva para anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi*, por técnica de HAI, IFI y EIA, presentó títulos iguales o mayores a 16, y solo el 2% títulos iguales a 8.

El 95% de los sueros provenientes de una población serológicamente no reactiva para anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi*, por técnica de HAI, IFI y EIA, presentó títulos inferiores a 8 y solo el 5% títulos iguales a 8.

Por lo expuesto el título 16 tendría máxima especificidad para la resolución entre muestras positivas y negativas. El título 8 por su máxima sensibilidad sería el ideal en el descarte de sangre para transfusiones. (Ver tabla I).

Utilidad de los Hematíes No Sensibilizados

Si hay Reacción Negativa en dilución 1/4 implica ausencia de anticuerpos heterófilos.

Si hay Reacción Positiva en dilución 1/4 implica presencia de anticuerpos heterófilos que puede interpretarse de dos maneras:

- Si hay reacción negativa en la dilución 1/8 (con el Antígeno) significa que el suero es NO REACTIVO para anticuerpos anti *T. cruzi*.
- Si hay reacción positiva en la dilución 1/8 (con el Antígeno) significa que la reactividad del suero puede ser específica o provocada por los anticuerpos heterófilos. Esta situación es poco frecuente debido a la presencia de adsorbentes de inespecificidad en el Diluyente de Muestras, pero en caso de observarse proceda a repetir el suero tratándolo con 2-ME.

Interpretación de los resultados con 2-ME

Sueros con títulos mayores o iguales a 8, se consideran reactivos para anticuerpos anti T. cruzi.

Títulos menores que 8 serán no reactivos para anticuerpos anti T. cruzi.

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

En estudios poblacionales con HAI CHAGAS POLYCHACO, se encontraron los siguientes valores según el título elegido:

Tabla I:

Título	Sensibilidad	Especificidad
8	100%	95%
16	98%	99%

Cuando los sueros son tratados con 2-ME la especificidad de la prueba a título 8 es del 100% sin variación en la sensibilidad.

LIMITACIONES DEL MÉTODO

La serología sólo constituye un dato auxiliar para el diagnóstico. La Hemaglutinación Indirecta, como cualquier otra técnica serológica, no puede ser concebida como un método de diagnóstico definitivo. En ese sentido, todo título debe ser interpretado como una probabilidad mayor o menor de acierto en relación al encuadramiento del caso estudiado, dentro de la población normal o parasitada.

Independientemente de esta limitación universal de la serología, existen en la Hemaglutinación Indirecta aspectos específicos de técnica que tienen que ser considerados por el ejecutante a fin de evitar errores.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sáez Alquézar, A.; Luquetti, A.O. and col.: Estudio multicêntrico: Avaliação do desempenho de conjuntos diagnósticos de hemaglutinação indireta, disponíveis no Brasil, para o diagnóstico sorológico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Pat. Trop.* 26(2): 343-374 (1997).
2. Storni, P.; Bakos, E.; Bustamante, A.; Arbino, M.O.: Diagnóstico serológico de infección chagásica en pre-conscriptos de la clase 1959. *Medicina (Buenos Aires)*. 39: 244-248 (1979).
3. Storni, P.; Bakos, E.; Bustamante, A.; Gualtieri, J.M.: Prevalencia de la infección chagásica en el nordeste argentino y correlaciones entre los métodos de diagnóstico serológicos utilizados. *Revista A.B.A.* 237: 69-77 (1979).
4. Cerisola, J.A.; Fatala Chaben, M.; Lazzari, J.O.: Test de hemaglutinación para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *La Prensa Med. Argent.* 49(34): 1761-1767 (1962).
5. Stavitsky, A.B.: Micromethods for the study of proteins and antibodies. Procedure and general applications of hemagglutination and hemagglutination-inhibition reactions with tannic acid and protein-treated red blood cells. *J. Immun.* 72: 360-367 (1954).
6. Boyden, S.V.: The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. *J. Exp. Med.* 93: 107-120 (1951).
7. Middlebrook, G.; Dubos, R.J.: Specific serum agglutination of erythrocytes sensitized with extracts of tubercle bacilli. *J. Exp. Med.* 88: 521-528 (1948).

LABORATORIO LEMOS S.R.L.

Director Técnico: Jorge O. Carradori. Bioquím. y Farm.

Santiago del Estero 1162

C1075AAX C.A.B.A. Argentina

Telefax: 4304-2204/2374

E-mail: lemos@biotica.com.ar

Producto de diagnóstico autorizado por el M.S. y A.S. Disposición. N° 8/84 y N° 3203 / 03.

Industria Argentina