

HEMAVE CHAGAS

Prueba de Hemaglutinación Indirecta Rápida para la detección de anticuerpos contra el Trypanozoma cruzi

Uso "In Vitro"
96 determinaciones cualitativas

APLICACIÓN

HEMAVE CHAGAS puede ser utilizado como auxiliar en el diagnóstico de casos presuntivos de Enfermedad de Chagas, para ensayos epidemiológicos o tamiz serológico.

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

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

La mayor velocidad de sedimentación de los hematies de ave, por ser nucleados, permite ofrecer una alternativa más rápida que la hemaglutinación con glóbulos rojos de carnero, en la detección de anticuerpos contra el Trypanosoma cruzi.

REACTIVOS Y MATERIALES PROVISTOS

- 1 Frasco N° 1: **Antígeno.** 2,7 ml de suspensión estabilizada de hematies de ave sensibilizado con antígeno de Trypanosoma cruzi. Agitar intensamente antes de usar.
- 2 Frascos N° 2: **Diluyente de Muestras.** 2,7 ml cada uno de solución salina isotónica con adsorbentes de inespecificidad y conservadores.

1 Frasco N° 3: **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.

1 Frasco N° 4: **Control Positivo.** 0,5 ml de una dilución de suero reactivo para anticuerpos contra T. cruzi, inactivado, con conservadores. Material potencialmente infeccioso. Listo para usar.

1 Frasco N° 5: **Solución Proteica.** 0,5 ml de solución proteica estabilizada, con conservadores.

1 Policubeta descartable con 96 pocillos, fondo en "V".

1 ansa calibrada de 2 μ l.

REACTIVOS Y MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS CON EL EQUIPO

- Microgoteros de 25 μ l
- Micropipetas de 25 μ l y 50 μ l
- Pipetas de 1 ml
- Espejo para lectura de policubetas o fondo blanco.
- Papel de filtro
- Agua destilada o agua desionizada

ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

Los reactivos son estables hasta la fecha que figura en la caja y frascos. Guardar los componentes del equipo entre 2 y 8 °C. Mantener los frascos en posición vertical una vez abiertos. **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.
- No utilizar el equipo después de la fecha de vencimiento.
- No mezclar reactivos de lotes diferentes.
- Verificar que el volumen de las micropipetas sea el correcto.
- **No congelar el equipo**, pues los glóbulos se autoaglutinan (formación de partículas sólidas macroscópicas). Si esto ocurre, debe descartarlo.

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 50 µl de Solución Proteica (frasco N° 5), por cada 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.

Control Negativo y Positivo (frascos N° 3 y 4): listos para usar. Estos controles se preparan a partir de suero humano no reactivo para HBsAg y para anticuerpos contra HCV y HIV, 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 limpio. La sangre se extraerá 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 en cada uno de los pocillos a emplear. Utilizar la cantidad de pocillos necesarios por cada muestra y controles que desea investigar.
2. Sumergir el ansa provista en la muestra a analizar. Observar visualmente que se ha formado una película líquida en el interior del anillo del ansa.
3. Sumergir el ansa con la muestra en un pocillo que contiene el Diluyente y homogeneizar por rotación de la misma.
4. Retirar el ansa.
5. Secar el ansa con papel de filtro de buena calidad para evitar el arrastre de fibras.
6. Enjuagar el ansa con agua destilada.
7. Secar el ansa con papel de filtro.
8. Repetir los pasos 5, 6 y 7 usando un nuevo recipiente de agua destilada. El ansa está lista para tomar la muestra siguiente.
9. Repetir los pasos 2 a 8 con los Controles Positivo y Negativo provistos en el equipo.

10. Depositar en cada pocillo utilizado, 25 μ l de Antígeno (Frasco N° 1) (ver preparación de los reactivos).
11. Agitar la policubeta golpeando con los dedos sobre sus paredes laterales, durante no menos de 30 segundos.
12. Dejar la policubeta en reposo entre 30 y 60 minutos y leer.

Esquema del procedimiento

Diluyente de Muestras (50 μ l de Solución Proteica por ml de Diluyente de Muestras).	25 μ l por pocillo
Suero, Control Positivo y Control Negativo.	1 ansada en los pocillos con el Diluyente de Muestras
Antígeno	25 μ l
Agitar manualmente la policubeta durante 30 segundos	
Dejar la policubeta en reposo entre 30 y 60 minutos y leer	

LECTURA

Luego de transcurridos 30-60 minutos, proceder a la lectura en espejo para policubetas o sobre un fondo blanco.

REACCIÓN POSITIVA: formación de un manto cuyos bordes pueden ser irregulares y que recubra todo el pocillo.

REACCIÓN DÉBILMENTE POSITIVA: formación de un manto alrededor de un botón poco nitido y poco compacto en el fondo del pocillo.

REACCIÓN NEGATIVA: formación de un botón nitido y compacto en el fondo del pocillo.

Nota: se recomienda efectuar la lectura entre los 30 y 60 minutos. Pasado este tiempo se sugiere observar con atención, ya que hay muestras reactivas (particularmente las de bajo título) cuyos mantos pueden disminuir con el tiempo formando un halo o nube alrededor de un botón dificultándose así su interpretación.

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 Control Positivo debe dar reacción positiva y el Control Negativo debe dar reacción negativa durante todo el período de vigencia del Kit.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Toda muestra que evidencie reacción positiva correspondería presumiblemente a un portador de anticuerpos contra el *Trypanosoma cruzi* y debe ser ensayada nuevamente para su confirmación. Si el resultado es positivo en el segundo ensayo debe confirmarse con otras técnicas inmunoserológicas como IFI o ELISA.

Toda muestra que de reacción negativa sería presumiblemente no reactiva para anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*.

PERFORMANCE

Estudios poblacionales sobre muestras reactivas y no reactivas para anticuerpos contra el *Trypanosoma cruzi* por otras metodologías como IFI, HAI y ELISA, dieron una concordancia total de aproximadamente 98% entre los métodos de referencia ensayados y el HEMAVE CHAGAS.

LIMITACIONES DEL MÉTODO

La serología sólo constituye un dato auxiliar para el diagnóstico. HEMAVE CHAGAS, como cualquier otra técnica serológica, no puede ser concebida como un método de diagnóstico definitivo ya que éste debe basarse en la correlación de los resultados de más de un test con los datos clínicos. En ese sentido, todo resultado debe ser interpretado como una probabilidad mayor o menor de acierto en relación al caso estudiado, dentro de la población normal o parasitada.

En infecciones muy recientes (menos de 30/45 días de evolución) la hemaglutinación puede presentar resultados negativos o reactividades muy bajas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cerisola, J.A.; Fatała 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).
2. 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).
3. 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).
4. Middlebrook, G.; Dubos, R.J.: Specific serum agglutination of erythrocytes sensitised 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 para diagnóstico autorizado por el M.S. y A.S. Certificado N°
000143/93 y N° 3203 / 03

Industria Argentina