
INTERÉS CLÍNICO

La enfermedad de Chagas es una parasitosis hística-hemática producida por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Es endémica en las regiones tropicales de América del Sur y América Central, donde se considera uno de los principales problemas de salud pública (1,2,3). En 1987 la OMS estimó en 90 millones el número de personas expuestas al riesgo de infección y en 20 millones el número de las ya infectadas en estas áreas.

Producto del largo período de incubación de esta afección y la aparición de una respuesta humoral temprana, la serología adquiere gran importancia en la detección precoz de los casos, de manera tal que se considera portador a cualquier individuo con resultado positivo en dos de los ensayos serológicos establecidos (inmunofluorescencia, hemaglutinación o fijación del complemento) (4).

La enfermedad atraviesa por tres fases: aguda, indeterminada y crónica. La fase aguda, comienza entre la primera y tercera semanas después de la infección inicial; la parasitemia es elevada pero los signos clínicos son por lo general inaparentes. En la etapa indeterminada disminuye la parasitemia haciéndose muy difícil su detección y el nivel de anticuerpos se incrementa. La fase crónica es frecuentemente mortal y se caracteriza por los daños irreversibles del miocardio y del tubo digestivo (5).

La transmisión tiene lugar básicamente por tres vías: picada de triatomíneos infectados, exposición a sangre contaminada y se ha demostrado también la transmisión vertical de la madre al feto por vía transplacentaria (6).

Por las características clínicas de signos inespecíficos en la fase inicial de la enfermedad, el período prolongado de incubación y las complicaciones fatales que ocurren en la fase crónica, se hace necesario disponer de métodos serológicos de elevada sensibilidad y especificidad (7,8,9).

El UMELISA CHAGAS es una técnica inmunoenzimática, que posibilita la detección de anticuerpos IgG específicos al *T. cruzi*, en muestras de suero humano o sangre seca sobre papel de filtro y puede ser utilizado con los siguientes fines:

- 1.-Pesquisaje de donantes de sangre.
- 2.-Pesquisaje de los grupos de riesgo en áreas endémicas.

FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El UMELISA CHAGAS es un ensayo inmunoenzimático indirecto en el cual se utiliza como fase sólida tiras de ultramicroELISA revestidas con tres péptidos sintéticos representativos de diferentes regiones inmunodominantes de la membrana del *Trypanosoma cruzi*, los cuales han sido obtenidos mediante síntesis química en fase sólida. Las muestras se incuban en los pocillos y si éstas contienen anticuerpos específicos se fijarán al antígeno del recubrimiento. A continuación, previo lavado que elimina los componentes no fijados, se añade un conjugado Anti IgG Humana/Fosfatasa Alcalina (F.A.). En caso de reacción positiva este anticuerpo marcado se unirá al complejo formado previamente sobre la fase sólida. Un nuevo lavado de las tiras elimina ahora el conjugado en exceso. Al añadir un sustrato fluorogénico (4-Metilumbeliferil fosfato) éste será hidrolizado y la intensidad de la fluorescencia emitida permitirá detectar la presencia de anticuerpos IgG específicos al *T. cruzi*.

CONTENIDO DEL ESTUCHE Y PREPARACION DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO.

Código UM 2014 (288 pruebas)

Contenido:

Placa recubierta de 12 tiras x 8 pocillos	3
R1: Solución Tampón	2 x 25 mL
R2: Suero de Carnero	1 x 18 mL
R3: Control Negativo	1 x 0,5 mL
R4: Control Positivo	1 x 0,5 mL
R5: Conjugado	1 x 7,5 mL
R6: Sustrato	1 x 2 mL
R7: Tampón Sustrato	1 x 18 mL

El lote de las placas recubiertas se muestra en el borde de su envase primario, el cual está compuesto por cinco dígitos, los cuatro primeros representan la fecha de vencimiento de las placas y el quinto representa un indicador numérico interno del proceso de producción.

Todos los reactivos contienen azida sódica (0,2 g/L) como preservante.

Los controles resultaron negativos a las pruebas de detección de Anti-VIH 1+2, HBsAg, Anti-VHC y VDRL. El Control Positivo ha sido inactivado por tratamiento térmico.

Preparación de las soluciones de trabajo:

R1: Para una tira de reacción, diluya 1 mL de la solución R1 hasta un volumen de 25 mL con agua destilada. Mezcle suavemente para evitar la formación excesiva de espuma. Prepare sólo lo necesario para el ensayo.

R2: Diluya 1:4 con solución de trabajo R1. Cantidad necesaria por tira: 2 mL (0,5 mL de R2 + 1,5 mL de R1). Prepare sólo lo necesario para el ensayo.

R3: Listo para usar.

R4: Listo para usar.

R5: Listo para usar. Cantidad necesaria por tira: 0,2 mL

R6: Diluya 1:10 con R7. Cantidad necesaria por tira: 0,5 mL (0,05 mL de R6 + 0,45 mL de R7). Prepare inmediatamente antes de usar y sólo lo necesario para el ensayo.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los reactivos deben mantenerse de 2 a 8 °C. En estas condiciones, serán estables en el envase original hasta la fecha de vencimiento.

Después de utilizar parte del contenido de los reactivos, el resto es estable durante **dos meses** si se mantienen las mismas condiciones de almacenamiento y se evita la contaminación durante la ejecución de la prueba.

Las tiras de reacción no utilizadas se mantienen estables durante **dos meses** de 2 a 8 °C en la bolsa suministrada, protegida con el desecante y herméticamente cerrada.

MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

- Agua destilada.
- Papel absorbente.
- Pipeta multicanal con puntas desechables para 10 µL.
- Pipetas de precisión entre 5 y 1000 µL.
- Probetas graduadas entre 10 y 250 mL.
- Incubadora a 37 ± 1 °C.

PRECAUCIONES

- Antes de comenzar a trabajar verifique que todos los reactivos estén completamente homogéneos y a temperatura ambiente.
- Manipule las muestras y los controles como potencialmente infecciosos. Utilice guantes desechables. Los materiales utilizados deben colocarse en soluciones desinfectantes (Hipoclorito de sodio al 5 %) o esterilizarse en autoclave.
- Las muestras de sangre seca deben ser colectadas sobre papel de filtro **S&S 903**.
- Las muestras de sangre seca colectadas sobre papel de filtro **S&S 903**, almacenadas de 2 a 8 °C o a -20 °C, son estables durante 3 meses y almacenadas a temperatura ambiente son estables durante 15 días. (10)
- Considere a los equipos y accesorios que han estado en contacto directo con las muestras como contaminados. Realice los procedimientos de limpieza que se recomiendan en los manuales de usuario correspondientes.
- Las tiras de reacción deben estar a la temperatura del laboratorio antes de retirarles la cubierta protectora.
- Utilice puntas limpias o nuevas para el trabajo con las soluciones y las muestras.
- No incorpore a los frascos originales remanentes de reactivos.
- Los sueros a utilizar deben ser preferentemente frescos, no inactivados por calor y sin precipitados. Evite la congelación y descongelación reiterada de las muestras.
- Verifique que todas las tiras de reacción estén bien niveladas en el soporte.
- Evite posibles contaminaciones con materiales fluorescentes.
- Tome todas las precauciones para **evitar la neutralización del conjugado** que puede producirse con material contaminado con suero humano.
- Verifique periódicamente la exactitud y precisión de las pipetas.
- Cumpla las normas de manipulación de los equipos utilizados y verifique previamente su adecuado funcionamiento, tenga especial cuidado en las operaciones de pipeteo y lavado.
- Evite la exposición a la luz de los frascos que contienen el sustrato.
- El juego de reactivos no debe emplearse después de la fecha de vencimiento.
- Los reactivos del **UMELISA CHAGAS** de lotes diferentes no se deben intercambiar.

PROCEDIMIENTO TÉCNICO

1.- Preparación de las muestras y controles.

Los controles se presentan listos para usar en el estuche. La preparación de las muestras varía, según se trate de muestras de suero o de sangre seca sobre papel de filtro.

Procedimiento A: Para muestras de suero:

Diluya las muestras 1:21 con la solución de trabajo R2 (5 µL de suero + 100 µL de la solución).

Procedimiento B: Para muestras de sangre colectadas en papel de filtro **S & S 903**:

Corte con un perforador para papel un disco de 3 mm de diámetro en la zona central de la mancha de sangre. Depositelo en un recipiente apropiado y añádale 25 µL de solución de trabajo R2. Mantener, como mínimo, una hora a temperatura ambiente (20 – 25 °C) y homogeneice ocasionalmente.

2.- Adición de las muestras y controles a las tiras de reacción.

Adicione 10 µL de las muestras previamente diluidas y de los controles sobre los pocillos de reacción, de acuerdo con el siguiente esquema de distribución:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83
B	B	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84
C	P	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85
D	P	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86
E	N	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87
F	N	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88
G	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
H	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90

El Control Positivo (P) y el Control Negativo (N) deben añadirse de forma manual con una pipeta de precisión. Como Blanco (B) utilice la solución R2 de trabajo.

Se recomienda evaluar las muestras por duplicado. Si utiliza el programa UMELISA CHAGAS para la interpretación automática de los resultados, debe colocar en las posiciones 1 y 2 la primera muestra, en las posiciones 3 y 4 la segunda y así sucesivamente.

3.- Incubación de las muestras y controles.

Procedimiento A: Para muestras de suero:

Incube las tiras durante 30 minutos a 37 °C en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura.

Procedimiento B: Para muestras de sangre colectadas en papel de filtro **S & S 903**:

Incube las tiras durante una hora a temperatura ambiente (20 - 25 °C) en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura.

4.- Lavado.

Lave las tiras de reacción cuatro veces. Verifique el llenado total del pocillo con la solución R1 de trabajo (28 a 30 µL). La solución debe permanecer como mínimo 30 segundos en los pocillos en cada lavado. Después de la última aspiración seque las tiras sobre papel absorbente.

5.- Adición del conjugado.

Con una punta nueva extraiga del frasco de conjugado la cantidad necesaria a emplear según el número de tiras del ensayo y deposítelo en un recipiente limpio.

Añada 10 µL del conjugado en cada pocillo de reacción.

6.- Incubación del conjugado.

Incube las tiras de reacción 30 minutos a 37 °C en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura.

7.- Lavado.

Lave las tiras de reacción según se describe en el acápite 4.

8.- Adición del sustrato.

Coloque 10 µL de sustrato convenientemente diluido en cada pocillo de las tiras de reacción.

9.- Incubación del sustrato.

Incube 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente (20 - 25 °C). En estas condiciones se garantiza una señal de fluorescencia del Control Positivo entre 60 y 180 unidades. Sin embargo, debido a las variaciones de temperatura se recomienda que cada laboratorio establezca su propio tiempo de incubación óptimo.

10- Lectura.

Realice la lectura de la intensidad de la fluorescencia emitida en cada determinación utilizando un lector de la serie SUMA.

La validación, interpretación de resultados y su impresión, son efectuados automáticamente por el lector SUMA con el programa UMELISA CHAGAS o pueden hacerse manualmente por el operador siguiendo las instrucciones que se describen a continuación.

CONTROL DE LA CALIDAD

Las condiciones mínimas requeridas para asegurar la calidad del ensayo son las siguientes:

a) Al menos uno de los duplicados del Blanco (B1 o B2) debe tener un valor de fluorescencia menor de 10 unidades.

b) Al menos uno de los duplicados del Control Negativo (N1 o N2) debe presentar una fluorescencia que no supere en más de 10 unidades a la media del Blanco.

c) Al menos uno de los duplicados del Control Positivo (P1 o P2) debe tener un valor de fluorescencia entre 60 y 180 unidades.

d) $(NN - BB) / (P - BB) < 0,1$.

Donde:

NN: Valor promedio del Control Negativo.

BB: Valor promedio del Blanco.

P: Menor valor de fluorescencia de los duplicados del Control Positivo que se encuentre dentro de los límites de calidad.

NIVEL DE CORTE

Las muestras de suero o sangre seca sobre papel de filtro se consideran reactivas cuando:

$$(Fi-BB) / (P-BB) \geq 0,300$$

Fi = Fluorescencia de la muestra.

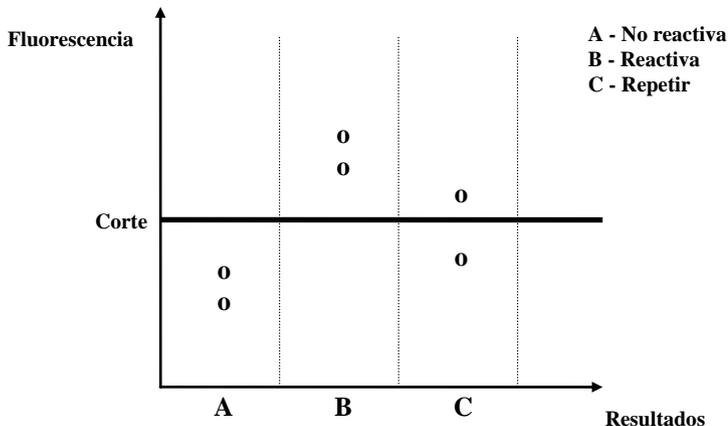
Para definir de una forma rápida el nivel de corte cuando no se dispone del programa automático, se calcula de la siguiente forma:

$$0,300 (P-BB) + BB$$

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

I- Muestras analizadas por duplicado

La interpretación de los resultados se realizará según el siguiente diagrama:



II- Muestras analizadas de forma simple:

- Si se obtienen valores menores que el nivel de corte la muestra se considera **NO REACTIVA**.

- Si una muestra presenta valores mayores o iguales que el nivel de corte, se considera **REACTIVA**.

Se recomienda que toda muestra con resultado ("**REACTIVO**") se repita antes de realizar una interpretación, utilizando la fuente original.

CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD.

En las siguientes tablas se presentan los resultados obtenidos con la utilización del UMELISA CHAGAS en la evaluación de muestras positivas y negativas para la enfermedad de Chagas, tomando como referencia las técnicas de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y Hemaglutinación Indirecta (HAI).

Muestras de suero:

Muestras	VP	FN	VN	FP	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
343	41	0	302	0	100	100

Muestras de sangre seca sobre papel de filtro:

Muestras	VP	FN	VN	FP	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
128	87	0	41	0	100	100

Leyenda:

VP: Verdaderos Positivos

FN: Falsos Negativos

VN: Verdaderos Negativos

FP: Falsos Positivos

REACTIVIDAD CRUZADA.

Reactividad del UMELISA CHAGAS con muestras de sueros correspondientes a otras enfermedades. (Estudio realizado en el Instituto Colombiano de Medicina Tropical “Antonio Roldán Betancur” y Resultados de la Validación interna del UMELISA CHAGAS en el Centro de Inmunoensayo).

	Muestras evaluadas	Muestras positivas por UME LISA CHAGAS
Leishmaniasis	82	0
Toxoplasmosis	3	0
Malaria	82	0
Lepra	3	0
Hepatitis C	3	0

No se observó reactividad cruzada al evaluar muestras de sueros positivos a Leishmania, Toxoplasma, Malaria, Lepra y Hepatitis C en el UMELISA CHAGAS.

Reactividad del UMELISA CHAGAS con muestras de sueros correspondientes a otras parasitosis relacionadas. (Estudio realizado en la Dirección de Vigilancia Epidemiológica Sanitario Ambiental, Laboratorio de Chagas, Maracay-Aragua, Venezuela”.

	Muestras evaluadas	Muestras positivas por UMELISA CHAGAS
Leishmaniasis	53	0

No se observó reactividad cruzada, al evaluar muestras de sueros positivos a Leishmania en el UMELISA CHAGAS.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Dias, J.P.C.: Bol. Ofic. Sanit. Panam. 99:244-256, 1985.
- 2.- Moncayo, A.: Chagas disease: epidemiology and prospects for interruption of transmission in the Americas. Wld. hlth. statist. quart. 45:276-279, 1992.
- 3.- Zicker, F.: Trend of T.cruzi infection based on data from blood bank screening. Rev. Inst. Med. trop. Sao Paulo 32:132-137, 1990.
- 4.- Kagan, I.G. et. al.: Evaluación de pruebas serológicas utilizadas para estudiar la enfermedad de Chagas. Bol. Of Sanit. Panam, 87(4), 1979.
- 5.- Pinto, D.J.C.: Enfermedad de Chagas. Epidemiología clínica terapéutica. Argentina. Programa de Salud Humana: 1-106, 1984.
- 6.- Pinto D.J.C.: Control of Chagas Diseases in Brazil. Parasitology Today. 3 (11), 1987.
- 7.- Camargo, M. E. et al.: Trypanozoma cruzi antibodies, en: Bergmeyer, H.V: Methods of Enzymatic Analysis. Third Edition Vol. XI: 368-382, V.C.H. Publishers, Weinhein, 1986.
- 8.- Ferreira, A.W. et al.: Standardization of serological tests in Chagas' disease: immunoenzymatic tests for screening of blood bank donors. Rev. Inst. Med. trop. Sao Paulo 33, 1991.
- 9.- Pan, A.A. et al.: Clinical evaluation of an EIA for the sensitive and specific detection of serum antibody to Trypanosoma cruzi (Chagas' disease). The J. of Infectious diseases 165: 585-588, 1992.
- 10.- Elves, L.H., Loeber, J.G., The need for standardized bloodspt TSH-calibrators in congenital hypothyroidism screening. Early Human Development 45: 179-190, 1996.

Febrero 19, 2007

Edición: No. 1

UMELISA CHAGAS

Código UM 2014

**Centro de Inmunoensayo. Calle 134 y Ave. 25, Apdo. Postal 6653,
La Habana, CUBA. Teléfono: 208-2929. Fax: (537) 208-6514.**