

TEST INMUNOCROMATOGRÁFICO EN UN SOLO PASO PARA LA DETECCIÓN EN SANGRE DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS CONTRA *Trypanosoma cruzi*

Solo para diagnóstico In Vitro

Para uso exclusivo en laboratorios clínicos y en hospitales

Conservar entre 2°C a 25°C

FINALIDAD PREVISTA

El Simple Chagas WB es un test inmunocromatográfico diseñado para detección en sangre fresca de anticuerpos específicos contra *Trypanosoma cruzi*. Este protozoo es el agente causal de la enfermedad o mal de Chagas.

FUNDAMENTO

Simple Chagas WB es una prueba inmunocromatográfica capaz de detectar anticuerpos específicos contra diversos antígenos inmunorrellevantes de *Trypanosoma cruzi*. Está basada en la captura inmunológica de micropartículas coloreadas y recubiertas de una proteína multiantigénica durante su paso a través de una membrana sobre la que se han inmovilizado la misma proteína multiantigénica.

En el caso de que la muestra contenga anticuerpos dirigidos contra *T. cruzi*, éstos reaccionarán con las partículas coloidales ROJAS que están conjugadas a la proteína multiantigénica. A continuación, los complejos de partículas coloidales-anticuerpos migrarán por cromatografía hacia la zona de reacción. En esta zona se ha depositado, en una primera línea, la proteína multiantigénica representativa de *T. cruzi*; que capturarán los complejos de partículas rojas-anticuerpos produciéndose una banda transversal de color ROJO.

En cualquier caso (muestra negativa o positiva), se verificará el desarrollo de una línea transversal de color AZUL que indica que la cromatografía se ha desarrollado correctamente y en condiciones que aseguran la reacción antígeno-anticuerpo.

MATERIALES INCLUIDOS EN EL KIT

- 20 Dispositivos de Reacción
- 20 Lancetas. Owen Mumford Ltd
- 20 Pipetas para recolección de sangre de 25 µL
- Tampón de dilución. 1 x 5 mL

PRECAUCIONES

1. Utilizar todos los reactivos únicamente *In vitro*.
2. Las muestras de sangre pueden contener agentes infecciosos y deberán ser tratadas y desechadas como materiales biológicos potencialmente peligrosos.
3. No intercambiar los componentes de kits con distinto número de lote.
4. No usar los componentes del kit después de las fechas de caducidad.
5. En caso de rotura del envase, el producto puede ser utilizado si ninguno de los componentes ha sido dañado.
6. El producto usado debe desecharse conforme a la legislación vigente.
7. No usar el test si aparece alguna línea de color en la zona de resul-

tados antes de empezar a usarlo.

ALMACENAMIENTO

Almacenar a 8-25 °C. Su fecha de caducidad está impresa en la envoltura.

MUESTRAS

- El test ha sido diseñado para su uso con muestras de sangre frescas no hemolizadas. Si el análisis no va a realizarse de inmediato, guardar las sangres a 4 °C durante no más de un día.
- El test no es apto para su uso con muestras de sangre congeladas.
- Simple CHAGAS WB puede utilizarse también con muestras de suero o plasma.

PROCEDIMIENTO

1. Dejar que los dispositivos de reacción alcancen la temperatura ambiente antes de abrirlos. Atemperar igualmente el tampón de dilución.
2. Sacar los dispositivos de reacción de su envoltura y colocarlos sobre una mesa o superficie horizontal.
3. Muestras. *Muestras de sangre (3.1) y muestras de suero (3.2)*

3.1 Muestras de sangre

3.1.1 Extracción

La sangre se debe extraer por punción digital en los dedos índice, medio o anular. Limpiar la punta del dedo con alcohol y dejar secar al aire. Poner la mano con la palma hacia arriba y hacer la punción del dedo con una lanceta NUEVA y estéril. Para ello:

1.-Empuje el protector amarillo hacia el interior del cuerpo de la lanceta, hasta que se oiga un chasquido.

2.-Gire el protector para romperlo y extráigalo para liberar la punta de la lanceta.

3.- Apoye el extremo libre de la lanceta sobre un dedo y presione la almohadilla activadora superior.

4.- Deposite la lanceta en un contenedor para objetos punzantes.

3.1.2 Adición de la muestra de sangre

3.1.2.a En el caso de recoger la muestra de sangre con la micropipeta provista en el kit:

Mantener el dedo por debajo del codo y apretar varias veces suave e intermitentemente en la base de la punción. Desechar la primera gota de sangre (limpiarla con una gasa estéril o un algodón).

Recoger la siguiente gota de sangre con una micropipeta nueva. Para ello, tocar la gota con la micropipeta, manteniéndola horizontal y con el orificio de ventilación libre.

Atención: Las operaciones de toma y deposición de esta muestra en el test deben realizarse de manera rápida para evitar que coagule la sangre en el interior de la micropipeta.

Esperar 30-60 seg, hasta que la sangre se absorba, y añadir en la misma ventana, gota a gota, dos gotas (con el gotero en posición vertical) o 100 microlitros de tampón de dilución.

Observar el **resultado a los 10 minutos**.

3.1.2.b Si no se usa la micropipeta suministrada en el kit:

Aplicar cuidadosamente 25 microlitros de sangre en el centro de la ventana circular señalada con una flecha (ventana de adición de la muestra). **Esperar 30-60 seg**, hasta que la sangre se absorba, y añadir en la misma ventana, gota a gota, dos gotas (con el gotero en posición vertical) o 100 microlitros de tampón de dilución.

Observar el **resultado a los 10 minutos**.

3.2 Muestras de suero

1. Preparar una dilución **1/15** del suero en el tampón de dilución del Simple Chagas WB. Por ejemplo: 10 µL de suero + 140 µL de tampón. Mezclar bien mediante pipeteo suave.
2. Añadir cuidadosamente **125 µL de la dilución**, gota a gota, en el centro de la ventana circular.
3. Observar el **resultado a los 10 minutos**.

RESULTADOS

- **NEGATIVO:** Aparece una sola línea transversal de color AZUL (control) en la parte superior de la tira.
- **POSITIVO:** Aparecen dos bandas transversales, una línea ROJA inferior (positivo Chagas) y una AZUL superior (control).
- **INVÁLIDO:** No aparece ninguna banda transversal. También deben considerarse inválidos los tests que en los que no aparece la línea control AZUL con independencia de que lo haga la línea roja. Un resultado inválido significa que la tira está estropeada (usualmente por la humedad), o que el manejo de la misma ha sido inadecuado. Si no aparece ninguna línea AZUL, el test es inválido, ya sea porque se realizó incorrectamente o porque los reactivos se han deteriorado.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. Dada la existencia de un periodo ventana postinfección en el que la concentración de anticuerpos es insuficiente para su detección, un resultado negativo no puede excluir la posibilidad de infección muy reciente por *T. cruzi*.
2. El diagnóstico final no se debe basar sólo en el resultado de un test. Se deberá fundamentar en la correlación de los resultados del test con otros datos adecuados y con la sintomatología clínica
3. Es importante controlar el tiempo de reacción. Si el tiempo de reacción es menor al indicado, las muestras que tienen una concentración de anticuerpo bastante superior al límite de sensibilidad se pueden observar claramente pero las que están en el límite no aparecerán.
4. El test es cualitativo y no debe hacerse ninguna interpretación cuantitativa en relación directa a la intensidad de la línea positiva

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNÓSTICA

Evaluación nº 1: En una evaluación llevada a cabo en el Instituto de Salud Carlos III (Madrid) con 92 muestras de sangre, 46 positivas y 46 negativas, el test ha mostrado una sensibilidad del 94 % y una especificidad del 96 %.

Evaluación nº 2: Se analizaron 501 muestras de sangres con el Simple Chagas WB, el ELISA de Biokit y un ELISA "in house" (Piron M. et al. "Transfusion", 2008; 48: 1862- 1868). La evaluación fue dirigida desde el Hospital Clinic de Barcelona y los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

		ELISAS	
		+	-
CHAGAS WB	+	55	4
	-	4	438

% de Concordancia = 98.4%

% Concordancia sensibilidad = 93.2 %

% Concordancia especificidad = 99.1 %

En esta evaluación:

- Se hizo un cribado a 454 personas. De ellas, 16 salieron positivas con el Simple Chagas WB. Se confirmaron 12 por ambos métodos ELISA, de los cuales 4 salieron negativos con los dos ELISA.
- Se analizaron 47 casos positivos para los dos ELISA, de los cuales 4 fueron negativos para el Simple Chagas WB. De ellos, 2 casos eran en pacientes no tratados, un caso en una paciente recién tratada (2 meses) pero con fallo terapéutico (PCR+) en el momento del test y el cuarto caso una paciente tratada un año antes. Los cuatro dieron valores ELISA positivos el mismo día de la extracción para el kit de OPERON.

REFERENCIAS

1. "Diagnosis of Chagas disease". López-Antuñano F.J. et al. *Revista Latinoamericana de Microbiología* (2000) 42: 121-129.
2. "Recent issues of the biochemistry and molecular biology of *Trypanosoma cruzi*". Travassos L.R. and Camargo E.P *Mem Inst Oswaldo Cruz* (1999) 94 (Suppl): 155-157.
3. "Screening and confirmation in Chagas Disease serology - A contribution". Oelemann WMR et al. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (1999) 94 (Suppl. I): 307-308.
4. "Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* chronic infections in humans: Usefulness of the complement regulatory protein antigens and lytic antibodies in the control of cure". *Mem Inst Oswaldo Cruz* (1999) 94 (Suppl. I): 301-304.
5. "The *Trypanosoma cruzi* genome project: Nuclear karyotype and gene mapping of clone CL Brener". Santos M. et al. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (1997) 92 (6): 821- 828.
6. "Evolution of knowledge on the etiological diagnosis of chagasic infection". O Luquetti A. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (1999) 94 (Suppl. I): 283-284.
7. "Chagas disease: Recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis". da Silveira J.F. et al. *TRENDS in Parasitology* (2001) 17 (6): 286-291.
8. "Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America". Umezawa E. S. *Journal of Clinical Microbiology* (1999) 37 (5): 1554-1560.