



# ImmunoComb® II

## Chagas Ab



Código 60481002

Formato: 3 x 12 Pruebas

Para uso diagnóstico in vitro solamente

### Uso Previsto

El Kit ImmunoComb® II Chagas Ab es una prueba rápida para la detección cualitativa de los anticuerpos del *Trypanosoma cruzi* presentes en suero y plasma humano. Un total de treinta y seis tests pueden ser realizados con un solo kit.

### Introducción

La enfermedad de Chagas es causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* y es muy difundida en América Latina. Este parásito puede ser transmitido por diferentes vías, ya sea por el contacto con heces de insectos triatomínicos, por la ruta transplacentaria o a través de transfusión de sangre no controlada. El éxito de los programas de control de vector ha limitado e incluso eliminado la propagación del insecto y por lo tanto, la transfusión de sangre por parte de donantes infectados constituye la principal vía para contraer la enfermedad de Chagas en áreas endémicas y no-endémicas. Existen tres etapas de infección de la enfermedad de Chagas. La etapa aguda, observada generalmente en niños, es por lo general asintomática, pero puede manifestarse como una inflamación local en el lugar de la picadura (Chagoma) o con manifestaciones febriles, hinchazón de los nódulos linfáticos, dilatación del hígado o del bazo y miocarditis. Los casos más agudos evolucionan durante 2 hasta 3 meses en un período crónico asintomático: la etapa **Indeterminada**. Durante este período, la seropositividad constituye la única indicación acerca de la existencia de la infección. La etapa sintomática **crónica** podrá desarrollarse al cabo de algunos años (10-20 años después) y su manifestación incluye cardiomiopatía, patologías del aparato digestivo como megaesófago y colonopatía, y en raros casos, enfermedades neurológicas. Los casos crónicos más graves pueden conducir a la muerte, provocada por lo general por un ataque cardíaco.

Los procedimientos diagnósticos basados en la demostración de los agentes causales como el xenodiagnóstico y el cultivo u otros métodos para la detección directa de antígenos de *T. cruzi*, están limitados a la etapa aguda. La baja parasitemia presente durante la enfermedad crónica, provoca una disminución en la sensibilidad de los métodos mencionados anteriormente y por lo tanto, no son apropiados para esta etapa. Los exámenes inmunológicos basados en anticuerpos constituyen los más útiles para el chequeo rutinario de la enfermedad de Chagas. Estos incluyen el examen de inmunofluorescencia indirecta, el examen de hemoaglutinación indirecta y ELISA. La mayoría de los exámenes, entre ellos los kits

comerciales, utilizan lisados de parásitos o antígenos fraccionados, especialmente de los epimastigotes de *T. cruzi*. Estos muestran una alta sensibilidad durante la etapa crónica de la enfermedad, pero durante la etapa aguda y la infección congénita muestran una baja sensibilidad así como también una especificidad limitada. Recientemente han sido descritos diferentes antígenos *T. cruzi* recombinantes con alta especificidad para ambas etapas de la enfermedad. El uso combinado de varios antígenos recombinantes en el mismo examen mejora la especificidad del diagnóstico, así como también su sensibilidad.

### Principio del Test

El test ImmunoComb® II Chagas Ab constituye un ensayo inmunoenzimático en fase sólida indirecto. La fase sólida está constituida por un peine con 12 proyecciones ("dientes"). Cada diente es sensibilizado en dos puntos:

Punto superior: inmunoglobulina humana (control interno).

Punto inferior: proteínas recombinantes de *Trypanosoma cruzi*.

La bandeja de desarrollo tiene 6 filas (A-F) de 12 pocillos. Cada fila contiene una solución reactiva lista para ser utilizada en cada etapa del ensayo. El test es realizado paso a paso, pasando el Peine de fila en fila y con un periodo de incubación en cada una de las etapas.

Para comenzar el test, las muestras de suero o plasma deben ser añadidas al diluyente en los pocillos de la fila A de la bandeja de desarrollo. Luego, el Peine es insertado dentro de los pocillos de la fila A. Los anticuerpos anti *T. cruzi*, en caso de estar presentes en las muestras, se combinarán específicamente a las proteínas recombinantes en los puntos inferiores del diente del Peine (Figura 1). En forma simultánea, las inmunoglobulinas existentes en las muestras serán capturadas por los anticuerpos a la inmunoglobulina antihumana en el punto superior (Control interno). Los componentes no combinados son lavados en la fila B. En la fila C, las inmunoglobulinas específicas capturadas en los dientes reaccionarán con anticuerpos de clase Ig antihumanos polivalentes conjugados con fosfatasa alcalina. En las dos filas siguientes, los componentes no combinados son removidos por medio de lavado. En la fila F, la fosfatasa alcalina ligada reaccionará con componentes cromogénicos. Los resultados pueden verse como puntos de color azul grisáceo en la superficie de los dientes del Peine.

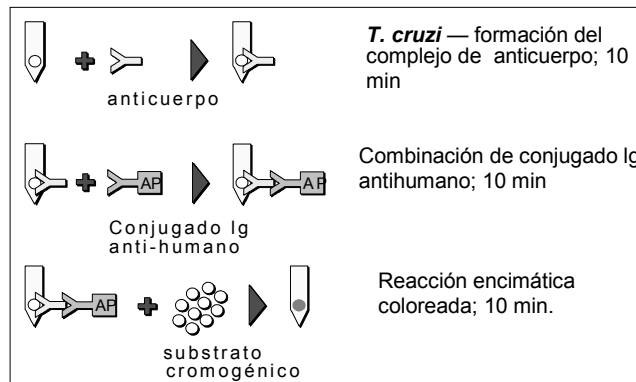


Figura 1. Principio del Test

El kit incluye un Control Positivo (contiene anticuerpos anti *T. cruzi*) y un Control Negativo que deben incluirse cada vez que se realiza el test. Al finalizar el test, los dientes utilizados con el Control Positivo deberán mostrar 2 puntos de color azul grisáceo; los utilizados con el Control Negativo mostrarán solamente el punto superior. El punto superior deberá asimismo aparecer en todos los otros dientes, para confirmar que la muestra fue añadida, que el kit funciona adecuadamente y que el test fue llevado a cabo en forma correcta.

### Contenido del Kit

#### Peines

El kit contiene 3 Peines de plástico. Cada Peine tiene 12 dientes, uno para cada test (Figura 2). Cada diente está sensibilizado con dos áreas reactivas:

Punto superior: inmunoglobulina humana (control interno).

Punto inferior: proteínas recombinantes de *Trypanosoma cruzi*.

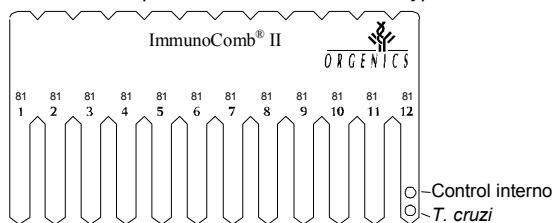


Figura 2. El Peine

Los peines son provistos en empaques de aluminio, que incluyen una bolsa desecante.

### Las Bandejas de Desarrollo

El Kit comprende 3 Bandejas de Desarrollo, cubiertas con papel de aluminio.

Cada Bandeja de desarrollo (Figura 3) contiene todos los reagentes necesarios para realizar el test. La Bandeja de desarrollo consiste de 6 filas (A-F) con 12 pocillos cada una. El contenido de cada fila es el siguiente:

Fila A	Diluyente de la muestra
Fila B	Solución de lavado
Fila C	Anticuerpos de cabra polivalentes de clase Ig anti-humanos, marcado como fosfatasa alcalina
Fila D	Solución de lavado
Fila E	Solución de lavado
Fila F	Solución de sustrato cromogénico que contiene 5-bromo-4-cloro-3 indolil fosfato (BCIP) y nitro azul tetrazolio (NBT)

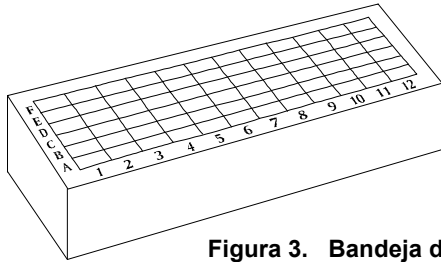


Figura 3. Bandeja de Desarrollo

**Control positivo** — 1 frasco (tapa roja) que contiene 0.2 ml de plasma humano diluido, inactivado por la adición de  $\beta$ -propiolactona y por termoterapia, positivo para anticuerpos anti *T. cruzi*.

**Control Negativo** — 1 frasco (tapa verde) que contiene 0.2 ml de plasma humano diluido inactivado por calor y negativo para anticuerpos anti *T. cruzi*.

**Perforador** — para perforar el papel de aluminio, que cubre los pocillos de la Bandeja de desarrollo.

### Seguridad y Precauciones

- El Control Positivo debe ser manejado como si fuera potencialmente infecciosas, incluso cuando haya sido desactivado.
- Todos los otros materiales de origen humano utilizados en la preparación de los controles han sido examinados y hallados no reactivos al antígeno de superficie de hepatitis B y a anticuerpos contra virus de hepatitis C y al VIH. Debido a que ningún método puede brindar seguridad absoluta acerca de la ausencia de contaminación viral, todas las soluciones de referencia y todas las muestras humanas deben ser tratadas como infecciosas en potencia.
- Utilice guantes quirúrgicos y vestimenta de laboratorio. Atégase a los procedimientos de laboratorio aceptados para el trabajo con suero o plasma humano.
- No pipetee por boca.
- Deseche todas las muestras, los Peines y otros materiales utilizados con el kit como residuos que constituyen peligro biológico.
- No mezcle reactivos de lotes diferentes.
- No utilice el kit luego de su fecha de expiración.

### Conservación y estabilidad del kit

- El kit es enviado a 2-8° C. Durante el transporte el kit puede ser conservado a menos de 30°C durante cortos períodos de tiempo que no excedan de 48 horas. Los controles internos indican que el kit no ha sido dañado durante el transporte.
- Conservar el kit en su caja original a 2-8°C.
- No congelar el kit.
- Después de abrir el kit inicialmente, los componentes deben ser conservados a 2-8° C.
- El funcionamiento del kit después de su apertura inicial, es estable hasta la fecha de caducidad del mismo si se conserva a 2-8° C.
- Después del uso inicial, el peine y la bandeja de reactivos no pueden ser utilizados más de tres veces.

\*Excepto cuando sean almacenados como documentación.

### Manejo de las Muestras

- Es posible usar suero o plasma en la prueba.
- Las muestras pueden ser almacenadas por 7 días a temperaturas de 2° a 8°C antes de la prueba. Para almacenar las muestras por más de 7 días, congélelas a -20°C o a temperaturas más bajas.
- Después de descongelar las muestras de suero, centrifúguelas. Use el sobrenadante para la prueba. Evite congelar y descongelar repetidamente.
- Los anticoagulantes como heparina, EDTA y citrato sódico no han mostrado tener efecto sobre los resultados del test.

### Procedimiento del Test

#### Equipo necesario (no proporcionado)

- Pipeta de precisión con puntas descartables para dispensar 10  $\mu$ l
- Tijeras
- Cronómetro o reloj de laboratorio.

### Preparación del Test

Todos los componentes deben estar a temperatura ambiente, incluyendo las Bandejas de desarrollo, los peines, los reactivos y las muestras; el test debe ser llevado a cabo a temperatura ambiente (22°-26°C).

#### Preparación de la Bandeja de desarrollo

- Coloque la Bandeja de desarrollo en una incubadora a 37°C durante 20 minutos o déjela a temperatura ambiente (22°-26°C) durante 3 horas.
- Cubra la mesa de trabajo con un papel absorbente que será descartado como residuo que constituye peligro biológico al finalizar el test.
- Mezcle los reagentes agitando la Bandeja de desarrollo.

**Nota:** No quite la cubierta de aluminio de la Bandeja de desarrollo. Rompa el papel de aluminio utilizando la punta descartable de la pipeta o el perforador, solamente cuando las instrucciones del test le indiquen hacerlo.

#### Preparación del Peine

**Cuidado:** Para asegurar el correcto funcionamiento del test, **NO toque** los dientes del Peine.

- Quite el empaque de aluminio del Peine por el borde con muecas y retire el Peine.
- Podrá utilizar el Peine y la Bandeja de desarrollo en su totalidad o solo una parte. Para utilizar parte del Peine:
  - Determine el número de dientes que necesitará para examinar las muestras y controles. Requerirá de un diente por cada test. Cada diente muestra el número de código "81" del kit, para posibilitar la identificación del diente suelto.
  - Doble el Peine y pártalo en forma horizontal o córtelo con las tijeras (vea Figura 4) para separar el número de dientes requerido. (No. de tests incluyendo 2 controles).
  - La parte del Peine no utilizada debe ser regresada al empaque de aluminio (con la bolsa desecante). **Cierre bien el empaque**, con un sujetapapeles por ejemplo, para mantener la sequedad. Almacene el Peine en su empaque original bajo temperatura de 2°-8°C, para su uso posterior.

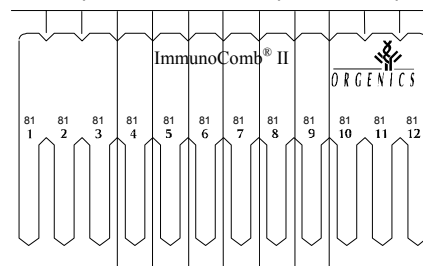


Figura 4. Fraccionamiento del Peine

#### Instrucciones del Test

##### Reacción Antígeno-Anticuerpo (Fila A de la Bandeja de desarrollo)

- Extraiga 10  $\mu$ l de muestra con la pipeta. Para las muestras guardadas en glicerina-buferada (dilución 1/2), extraiga 20  $\mu$ l. Perfore el papel de aluminio de uno de los pocillos de la fila A de la Bandeja de desarrollo con la punta de la pipeta o con el perforador; coloque la muestra en la parte inferior del pocillo. **Mezcle** rellenando y expulsando la solución repetidamente. Deseche la punta de la pipeta.
- Repita el paso número 1 para las otras muestras, incluyendo un Control positivo y un Control negativo suministrados con el kit. Utilice un nuevo depósito en la fila A y cambie las puntas de la pipeta para cada muestra o control.
- Inserte el Peine (con la cara impresa mirando hacia Ud.) dentro de los pocillos de la fila A que contiene muestras y controles. **Mezcle:** Quite e inserte el Peine dentro de los pocillos varias veces.
  - Deje el Peine en la Fila A durante 10 minutos exactamente. Configure el cronometrador. Mezcle dos veces más

durante la incubación. Un poco antes de finalizar los 10 minutos, perfora el papel de aluminio de la fila B utilizando el Perforador. No abra más pocillos de los necesarios.

- c. Al cabo de 10 minutos, quite el Peine de la Fila A. **Absorba el líquido adherido** de las puntas **puntiagudas** de los dientes con papel abse orbentimpio. No toque la superficie frontal de los dientes.

*Primer lavado (Fila B)*

4. Inserte el Peine dentro de los pocillos de la fila B. **Agíte**: quite el Peine vigorosamente e insértelo en los pocillos durante 10 segundos por lo menos para obtener un lavado adecuado. Repita esta acción varias veces durante el transcurso de 2 minutos; mientras tanto, perfora el papel de aluminio de la fila C. Al cabo de 2 minutos, quite el Peine y **absorba el líquido adherido** como en el paso 3c.

*Reacción con el conjugado (Fila C)*

5. Inserte el Peine dentro de los pocillos de la fila C. **Mezcle** los Peines varias veces. Configure el cronometro en 10 minutos. **Mezcle** como en el paso 3b. Perfora el papel de aluminio de la fila D. Al cabo de 10 minutos, quite el Peine y **absorba el líquido adherido**.

*Segundo lavado (Fila D)*

6. Inserte el Peine dentro de los pocillos de la fila D. Agite en forma repetida durante 2 minutos, como en el paso 4. Mientras tanto, perfora el papel de aluminio de la fila E. Al cabo de 2 minutos, quite el Peine y **absorba el líquido adherido**.

*Tercer lavado (Fila E)*

7. Inserte el Peine dentro de los pocillos de la fila E. Agite en forma repetida durante 2 minutos. Mientras tanto, perfora el papel de aluminio de la fila F. Al cabo de 2 minutos, quite el Peine y **absorba el líquido adherido**.

*Reacción de color (Fila F)*

8. Inserte el Peine dentro de los pocillos de la fila F. **Mezcle** como en el paso 3a. Configure el cronometro para 10 minutos. **Mezcle** como en el paso 3b. Al cabo de 10 minutos, quite el Peine.

*Reacción final (Fila E)*

9. Inserte el Peine nuevamente en la fila E. Al cabo de 1 minuto, quítelo y déjelo secar al aire.

*Eliminación de residuos*

Deseche las Bandejas de desarrollo, las puntas de las pipetas, el papel absorbente y los guantes como residuos que constituyen peligro biológico.

## Almacenamiento de partes del Kit no utilizadas

*Bandeja de desarrollo*

Si no ha utilizado todos los pocillos de la Bandeja de Desarrollo, podrá guardarlos para un futuro uso:

- Cierre los pocillos utilizados con cinta adhesiva gruesa, de manera que no se vierta nada, incluso si la Bandeja de desarrollo es dada vuelta.

*Otros materiales del kit*

- Regrese la(s) Bandeja(s) de desarrollo, el/los Peine(s), el perforador, los controles y las instrucciones al empaque original de la caja. Almacénelos bajo temperatura de 2°- 8°C.

## Resultados del test

**Validación**

Para confirmar que el test funciona en forma correcta y demostrar que los resultados son válidos, deberán cumplirse las tres siguientes condiciones (véase la Figura 5):

- El **Control Positivo** debe producir **dos puntos** en el diente del Peine.
- El **Control Negativo** debe producir un punto **superior** (Control Interno).
- Cada muestra analizada** debe producir un punto **superior** (Control Interno). Esto confirmará así mismo que dicha muestra fue añadida.

Si alguna de estas tres condiciones no se cumple, los resultados serán considerados no válidos y tanto las muestras como los controles deberán ser examinados nuevamente.

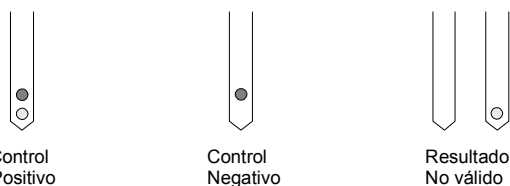


Figura 5. Validación del test

## Interpretación de los resultados

- La sola aparición del punto **superior** (Control Interno) indica que la muestra no es reactiva a los anticuerpos contra *T. cruzi* (Figura 6a).
- Un punto circular **inferior** indica la presencia de anticuerpos contra *T. cruzi* (Figura 6b).



a) Resultado negativo

b) Anticuerpos a *T. cruzi* presentes

Figura 6. Resultados del Test

*Documentación de los resultados*

La estabilidad del color formado en el Peine permite que los mismos puedan ser guardados para documentación posterior.

## Limitaciones

En forma similar a otros test destinados a uso diagnóstico *in vitro*, los resultados de este test deben ser evaluados en forma relativa a todos los síntomas, a la historia clínica y a otros hallazgos de laboratorio relacionados con el paciente.

## Características del Ensayo\*

En un estudio múltiple realizado en Centro y Sur América, la prueba ImmunoComb® II Chagas Ab fue evaluada en muestras de sangre de pacientes clínicamente y serológicamente diagnosticados como portadores de la enfermedad de Chagas en la fase crónica y aguda, como también en individuos asintomáticos (indeterminados) de la enfermedad de Chagas. Las muestras negativas fueron recolectadas de donadores de sangre sanos de varias áreas endémicas y no endémicas, de pacientes cardiacos no chagasicos, y de pacientes con otras enfermedades infecciosas parásiticas y no parásiticas clínicamente diagnosticadas, todas serológicamente probadas negativas a la enfermedad de Chagas. (tabla 1)


Tabla 1. Sensibilidad y Especificidad del kit ImmunoComb® II Chagas Ab en muestras de pacientes y de donadores de sangre en América Latina

País	Muestra evaluada	Sensibilidad %	Especificidad %
Honduras	250	100	98.5
Colombia	150	100	100
Brazil	435	99	95.5
Chile	339	100	99.1
total	1164	99.5	98.2







\*Datos detallados serán suministrados en caso de ser solicitados

## Bibliografía

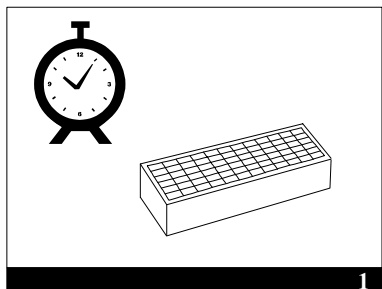
- Wendel S, Brener Z, Camargo ME, Rassi A (eds). 1992. Chagas Disease (American Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine. ISBT, Brazil '92, São Paulo, Brazil.
- Kierszenbaum F. 1999. Chagas' Disease and the autoimmunity hypothesis. Clin. Microbiol. Rev. 12(2): 210- 223.
- Schmunis GA. 1991. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' Disease: Status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. Transfusion 31: 547-557.
- Hamerschlak N, Pasternak J, Neto VA, de Cavalho MB, Guerra CS, Coscina AL, Ferreira OC, Rosenblit J, Sztterling LN. 1997. Chagas' Disease: An algorithm for donor screening and positive donor counseling. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 30(3): 205-209.
- Umezawa ES, Bastos SF, Camargo, ME, Yamauchi LN, Santos MR, Gonzalez A, Zingales B, Levin MJ, Sousa O, Rangel-Aldao R, da Silveira JF. 1999. Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' Disease in South and Central America. J. Clin. Microbiol. 37(5):1554-1560.
- Lorca M, Veloso C, Munoz P, Bahamonde MI, Garcia A. 1995. Diagnostic value of detecting specific IgA and IgM with recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens in congenital Chagas' Disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 52(6): 512-515.

<p><b>Fabricante:</b></p>  <p><b>ORGENICS</b></p> <p>Orgenics Ltd., part of the Inverness Medical Innovations Group. P.O.B 360 Yavne 70650, Israel Tel: ++ 972 8 942 92 01 Fax: ++ 972 8 943 87 58</p>	<p><b>Representante autorizado en UE:</b></p> <p>Orgenics France S.A. 19, rue Lambrechts 92400 Courbevoie, France Tel: +33-1 41 99 92 90 Fax: +33-1 41 99 92 95</p> <p><b>Version: 60481002/S8/OR (05/2007)</b></p>
---	---

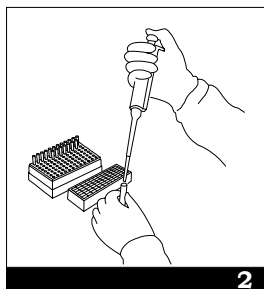
### Leyenda de los símbolos

<b>CARD</b>	ImmunoComb® tarjeta
<b>PLATE</b>	Bandejas de Desarrollo
<b>CONTROL +</b>	Control positivo
<b>CONTROL -</b>	Control negativo
<b>PERFORATOR</b>	Perforador
	Consulte las instrucciones de uso
	Atención, ver instrucciones de uso
<b>IVD</b>	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Límite de temperatura
	Contenido suficiente para n ensayos
	Fabricante
<b>EC REP</b>	Representante autorizado en la Comunidad Europea
<b>REF</b>	Número de catálogo
<b>LOT</b>	Código de lote
	Fecha de caducidad
<b>SN</b>	Número de serie

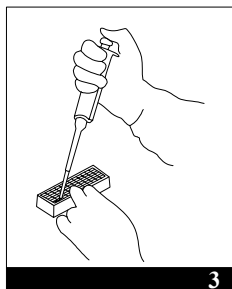
## Resumen de los principales pasos del test



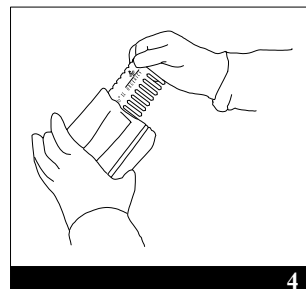
**1**  
Preincubación de la Bandeja de desarrollo: 3 horas a temperatura ambiente, ó 20 minutos a 37°C



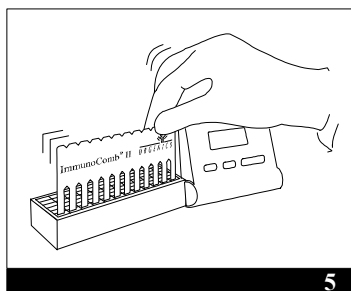
**2**  
Obtención de muestras y controles



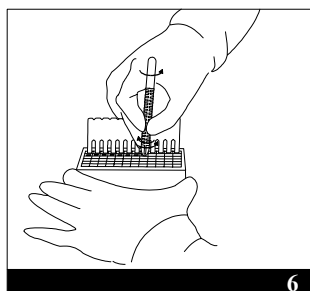
**3**  
Adición de muestras y controles a la fila A. Mezcla.



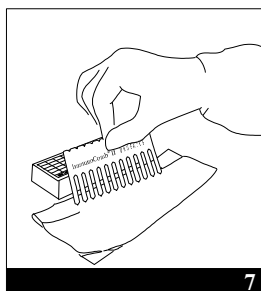
**4**  
El Peine es quitado del empaque.



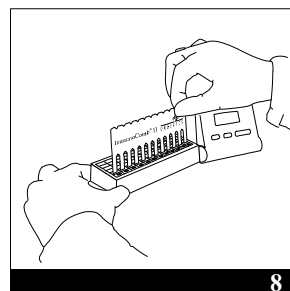
**5**  
Inserción del Peine y mezcla en fila A. Incubación



**6**  
Apertura de la fila B

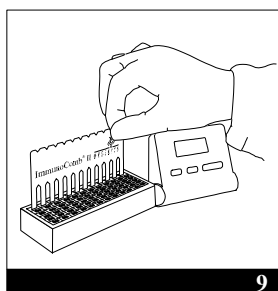


**7**  
Absorción de líquido adherido al diente.

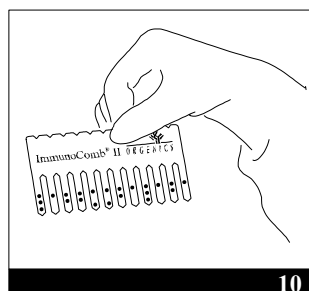


**8**  
Inserción del Peine y agitación en fila B. Incubación

Luego de mezclar/ agitar e incubar en las filas C, D y E...



**9**  
Reacción coloreada en fila F.



**10**  
Resultados

## Resumen del Procedimiento del Test

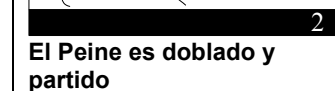
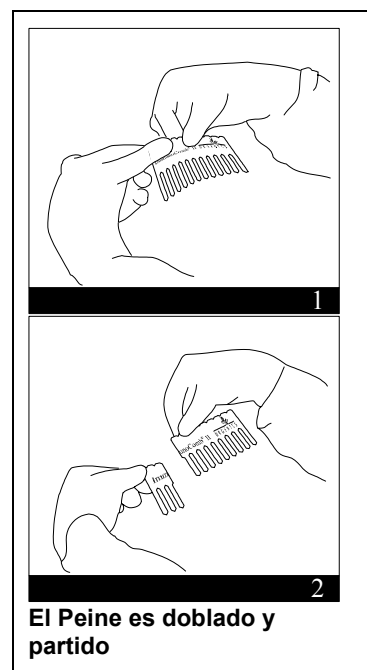
Las instrucciones abreviadas a continuación están dirigidas a usuarios expertos con el Kit de test ImmunoComb® II Chagas Ab.

(Para instrucciones detalladas, refiérase al texto completo)

1. Todos los componentes, las Bandejas de desarrollo, los peines, los reactivos y las muestras deben estar a temperatura ambiente; el test debe ser realizado a temperatura ambiente (22°-26°C).
2. Dispense 10 µl (20 µl en caso de glicerinado) de cada muestra y control en pocillos separados de la fila A en la Bandeja de desarrollo y mezcle.
3. Inserte el Peine en la fila A y continúe según lo descrito en la Tabla 1:

Tabla 1. Resumen de los pasos del test

Paso	Fila	Procedimiento a seguir
Reacción antígeno-anticuerpo	A	Mezcle; incube 10 minutos; absorba
Lavado	B	Agite; incube 2 minutos; absorba.
Unión de conjugado	C	Mezcle; incube 10 minutos; absorba
Lavado	D	Agite; incube 2 minutos; absorba.
Lavado	E	Agite; incube 2 minutos; absorba.
Reacción coloreada	F	Mezcle; incube 10 minutos; absorba
Dentención de la reacción	E	Incube 1 minuto; seque al aire.



**2**  
El Peine es doblado y partido