

MANUAL DE INSTRUCCIONES:

1) NOMBRE DEL PRODUCTO: IFIFLUOR PARASITEST CHAGAS

2) USO A QUE ESTA DESTINADO Y LEYENDA USO IN VITRO:

Equipo por inmunofluorescencia para la determinación de anticuerpos anti *Tripanosoma cruzi* séricos por inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico de CHAGAS. USO IN VITRO.

3) NÚMERO DE UNIDADES DE ANÁLISIS:

El equipo permite 25 - 50 - 100 determinaciones de sueros individuales.

4) FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Resulta de gran valor diagnóstico la evaluación de la respuesta inmune a la infección por *Tripanosoma cruzi*. La detección de anticuerpos contra el parásito puede ser efectuada por diferentes técnicas ELISA, aglutinación, hemaglutinación, látex, inmunofluorescencia (IFI). Las técnicas de IFI son extremadamente sensibles y específicas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Dan resultados positivos tanto la infección temprana: 72% en la primera semana, 89% al mes hasta alcanzar el 100% en los primeros 4 meses y persistiendo en este porcentaje hasta los dos años de observación.

El equipo IFIFLUOR PARASITEST CHAGAS emplea la técnica de inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos séricos anti-*Tripanosoma cruzi*. El suero del paciente en una dilución adecuada, se enfrenta con las improntas que contienen el parásito. Los anticuerpos específicos, si están presentes, se unen al sustrato antigénico. Luego de lavar para eliminar los componentes no unidos, los anticuerpos unidos reaccionan con la antigamma globulina marcada con FITC. Un segundo lavado elimina los elementos no unidos. Finalmente, luego de montados y cubiertos con cubreobjetos, se observa la fluorescencia bajo microscopio de fluorescencia.

5) RESUMEN Y EXPLICACION DEL ENSAYO

1. RECONSTITUCION DEL BUFFER FOSFATO SALINO (BFS) Disolver el sobre del buffer en 1 litro de agua destilada. Conservar en la heladera hasta 4 semanas.

2. DILUCION DE LAS MUESTRAS: Para CHAGAS: El suero debe ser inactivado por 30 minutos a 56°C y luego se realiza una dilución 1/30. Por ejemplo 0,1ml de suero en 2,9 ml de buffer BFS. De ser necesario titular, hacer las diluciones con buffer BFS. NO DILUIR LOS CONTROLES DEL EQUIPO, SON LISTOS PARA USAR

3. PREPARACION DE LAS IMPRONTAS DE PARASITOS:

A) Retirar los portaobjetos del envase, dejar secar a temperatura ambiente.

B) Sembrar los sueros controles positivos, negativos y muestras a procesar. Precaución de no tocar con la pipeta las áreas reactivas, dejando caer suavemente la gota de la dilución sobre el área reaccionante.

4. INCUBACION: Incubar 20 minutos a temperatura ambiente (18-25°C), tapando la bandeja de incubación para evitar la evaporación de las muestras.

5. LAVADO: Sacar los portaobjetos y lavarlos con abundante BFS derramando con una pipeta el líquido directamente sobre cada área para evitar la contaminación entre las mismas. Sumergir los portaobjetos 5 minutos en BFS en un frasco tipo Coplin agitando suavemente. Retirar el BFS del Coplin y reemplazarlo por BFS limpio dejando en reposo por 5 minutos más. El lavado puede prolongarse más tiempo sin afectar los resultados.

6. INCUBACION CON ANTIGAMMA GLOBULINA HUMANA MARCADA CON ISOTIOCIANATO DE FLUORESCINA. (diluir la previamente con BFS según rótulo). Sacar los portaobjetos del baño con BFS. Secar con papel de filtro entre las áreas y cubirlas con la ANTIGAMMA. Incubar a temperatura ambiente 20 minutos. La bandeja de incubación debe estar tapada para evitar la evaporación de la antigamma.

7. LAVADO: Repetir paso 5.

8. Cubrir las áreas reactivas con la solución de Azul de Evans durante 2 minutos, lavar con BFS y secar suavemente con papel de filtro alrededor de las áreas reactivas.

9. MONTAJE: Sacudir suavemente los portaobjetos sobre papel de filtro. Secar entre las áreas con el papel de filtro, cuidando de no tocar las áreas reactivas. Montar con cubreobjetos escrupulosamente limpios y una gota de medio de montaje. Cubrir los portaobjetos suavemente evitando la formación de burbujas que dificultan la lectura.

10. LECTURA: Leer en lo posible dentro de las primeras horas. Se pueden conservar en heladera 2-8°C por algunos días sellando los bordes del cubreobjeto con esmalte de uñas.

6) INSTRUCCIONES PARA SU CONSERVACION:

Inmediatamente de recibir el equipo guardar las improntas en freezer a -20°C y el resto del equipo en heladera de 2-8°C.

7) FORMA DE PRESENTACION:

Equipos de 25, 50 y 100 determinaciones.

8) COMPOSICION, DESCRIPCION CUALI-CUANTITATIVA DE LOS COMPONENTES. INDICACIONES ACERCA DE LA PREPARACION DE LOS COMPONENTES EN CASO DE NO SER LISTOS PARA USO

MATERIALES PROVISTOS

Según sean 25, 50 o 100 determinaciones:	25 det.	50 det.	100 det
Portaobjetos de 7 áreas reactivas (5 det + 2 controles)	5	10	20*
Antigamma globulina humana marcada con FITC	0.10 ml	0.20 ml	0.30 ml**
Sobre de buffer fosfato salino pH 7,2 ± 0.2 para reconstituir a 1 litro	1	2	3
Suero humano control positivo listo para usar	1.00 ml	1.00 ml	1.00 ml
Suero humano control negativo listo para usar	1.00 ml	1.00 ml	1.00 ml
Medio de montaje	3 ml	5 ml	5 ml
Cubreobjetos (opcional)	5	10	20***
Instrucciones de uso	1	1	1

*Los equipos de 100 det. pueden incluir 10 portaobjetos de 12 áreas (10 det + 2 controles) en lugar de los portaobjetos de 7 áreas. Esos equipos contienen 0.20 ml de antigamma y 10 cubreobjetos.

PREPARACION DE LOS REACTIVOS:

1. RECONSTITUCION DEL BUFFER FOSFATO SALINO (BFS) Disolver el sobre del buffer en 1 litro de agua destilada. Conservar en la heladera hasta 4 semanas.

2. DILUCION DE LA ANTI-GAMMA GLOBULINA HUMANA: Diluir el volumen a utilizar en BFS de acuerdo a la dilución recomendada en el rótulo del frasco.

MATERIALES REQUERIDOS, NO PROVISTOS

- Agua destilada para reconstituir el buffer BFS
- Tubos de ensayo para realizar las diluciones de las muestras y la antigamma
- Pipetas de 5 ml y pipetas automáticas
- Cámara húmeda o placas de Petri con papel humedecido
- Frascos tipo Coplin
- Cronómetro
- Microscopio de fluorescencia

9) MUESTRAS A EMPLEAR . CONDICIONES DE OBTENCION DE LA MISMA.

El ensayo utiliza muestras de suero humano obtenidas luego de la coagulación de la sangre proveniente de punción venosa. Se debe emplear suero inactivado durante 30 min. a 56°C, no usar muestras lipémicas, hemolizadas o contaminadas. Si no se procesan inmediatamente los sueros, se pueden conservar congelados a -20°C por un tiempo prolongado. PRECAUCION: Evitar los ciclos de congelamiento-descongelamiento de las muestras.

10) CALCULO DE RESULTADOS, UNIDADES DE EXPRESION, ORIGEN DE LOS PATRONES UTILIZADOS O DE SUEQUIVALENCIA EN ESTANDARES INTERNACIONALES

Los resultados se expresan como positivos (fluorescencia verde manzana) o negativos (no fluorescentes).

Los tripanosomas se tiñen intensamente de color amarillo verdoso en las reacciones positivas. El control negativo debe observarse cuidadosamente, no debe colorearse o hacerlo muy levemente. En el caso de utilizar Azul de Evans los parásitos se observan con una coloración rojiza.

Los patrones internos utilizados para calibrar este equipo son provistos por el Instituto Fatała Chaben de Buenos Aires.

11) INTERVALO DE NORMALIDAD O INTERVALO TERAPEUTICO:

El ensayo resulta negativo en los sueros de los pacientes que no han tenido contacto con el T. cruzi.

12) DESCRIPCION DE LAS CARACTERISTICAS DEL SISTEMA: SENSIBILIDAD, PRECISION, EXACTITUD, ESPECIFICIDAD, POTENCIA, ESTABILIDAD.

Sensibilidad: La técnica de inmunofluorescencia indirecta esta considerada de extrema sensibilidad desde los trabajos originales de Coons. La inmunofluorescencia indirecta es el método que permite el diagnóstico inmunológico más temprano de la enfermedad de Chagas, con una positividad inicial del 72 %, que aumenta progresivamente hasta el 100 % en el cuarto mes de la primoinfección. La sensibilidad de esta técnica en la etapa crónica de la enfermedad (sintomática o asintomática) es del 100%.

Precisión: Se han realizado repeticiones del ensayo para una serie de 10 sueros positivos, de diferentes títulos, incluyendo positivos débiles y fuertes. En ningún caso los resultados difirieron en más de un título, tanto intraensayo como interensayo.

Especificidad: Se han testeado sueros positivos para diferentes patologías autoinmunes y parasitarias, obteniéndose en todos los casos resultados negativos.

La intensidad de la fluorescencia, así como el punto final de la titulación es afectada por el equipamiento utilizado (desgaste de la lámpara, óptica del microscopio, etc.). Consulte a nuestro Laboratorio por los controles titulables que permiten verificar y estandarizar los resultados de fluorescencia.

Estabilidad: Conservando el equipo en las condiciones especificadas, el material no sufre deterioro dentro del plazo de actividad fijado. La anti-gamma diluída no debe reutilizarse y debe ser preparada fresca en cada ensayo. El buffer BFS es estable durante 4 semanas a 2-8°C. Se recomienda el filtrado del buffer reconstituido.

13) PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS SOBRE SU USO. LIMITACIONES DEL METODO, SUSTANCIAS INTERFERENTES, ETC.**PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS:**

-Los componentes de suero humano utilizados en la preparación de los controles de este equipo han sido encontrados no reactivos para la presencia de antígeno de superficie de Hepatitis B (HBsAg), anticuerpos anti-virus de inmunodeficiencia humana I y II (HIV-I+II) y Hepatitis C. Dado que ningún test diagnóstico puede ofrecer una seguridad absoluta acerca de la ausencia de los virus HIV, Hepatitis B u otros agentes infecciosos, las muestras y los reactivos basados en productos humanos deben ser tratados como potencialmente infectivos.

-No usar los reactivos contenidos en el equipo después de la fecha de vencimiento impresa en el equipo.
-Todas las incubaciones deben realizarse en cámara húmeda o en una placa de Petri que contenga papel de filtro humedecido para evitar la evaporación de los reactivos.

-Se deben mantener húmedas las áreas reactivas durante toda la técnica (evitar cualquier técnica de secado artificial como: secado al aire, con estufa y/o secadores). Después de los pasos de lavado, se recomienda remover el exceso de humedad con papel absorbente; secar los bordes laterales externos del portaobjetos y secar con cuidado entre las áreas, sin tocar las áreas reactivas.

-Algunos de los componentes de este equipo contienen azida de sodio como conservante. La azida de sodio puede reaccionar con el plomo o el cobre de las cañerías, formando azidas metálicas explosivas. Cuando se descarten los reactivos, dejar fluir abundante agua para evitar la formación de estos compuestos.

-Nunca pipetear con la boca o permitir que muestras de pacientes entren en contacto con la piel.

-Todos los materiales usados en este ensayo, incluyendo los reactivos, muestras y materiales para limpieza deben ser descartados de manera que se inactiven los agentes infecciosos. Se recomienda utilizar en la descontaminación, hipoclorito de sodio al 1%, durante un tiempo igual o mayor a 30 minutos.

-La técnica ha sido estandarizada para una temperatura ambiente estándar (18-25°C), desvíos importantes de esa temperatura pueden producir resultados inconsistentes.

-Sólo para uso diagnóstico in vitro.

LIMITACIONES

-El usuario del equipo debe leer cuidadosamente el inserto. El cumplimiento estricto del protocolo es indispensable para obtener resultados confiables. Ante cualquier duda comunicarse con nuestro Servicio de Asesoría Técnica.

-El exceso de lípidos en el suero a testear produce una reacción "filming" (película que encubre la reacción específica). No confundir con reacción positiva.

14) BIBLIOGRAFIA:

-COONS AH, CREECH HJ, JONES RM, THE DEMONSTRATION OF NEUMOCOCCAL ANTIGEN IN LISSIES BY THE USE OF FLUORESCENT ANTIBODY. J. IMMUNOL 1942, 45:159-170

-AMERICAN TRYPANOSOMIASIS RESEARCH (SC. PUB. N° 318 PANAMERICAN HEALTH ORGANIZATION PAHO 206-211,1975)

- DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS/ANALES F.L.I.P. 14:1974.

- CARVALHO MR, KRIEGER MA, ALMEIDA E, ET AL. CHAGAS'DISEASE DIAGNOSIS: EVALUATION OF SEVERAL TESTS IN BLOOD BANK SCREENING. TRANSFUSION 1993; 33:830-834.

- PAN AA, ROSENBERG GB, HURLEY MK, SCHOCK GJH, CHU VP, AIYAPPA A. CLINICAL EVALUATION OF AN EIA FOR THE SENSITIVE AND SPECIFIC DETECTION OF SERUM ANTIBODY TO TRYPANOSOMA CRUZI. (CHAGAS' DISEASE). J. INFECT DIS 1992; 165:585-588.

-SCHATTSCHNEIDER W, LOPES ER, DE ALENCAR JE, BIENZLE U, FELDMEIER H. A COMPARATIVE STUDY OF FOUR SEROLOGICAL METHODS FOR DIAGNOSIS OF ACUTE AND CHRONIC CHAGAS'DISEASE IN BRAZILIAN PATIENTS. TROP GEOGR MED 1992; 44:210-218.

-ROSS A, NOVOA, MONTERO D. COMPARABILITY AND RELIABILITY OF ELISA, IMMUNOFLUORESCENCE, AND INDIRECT HEMAGGLUTINATION ASSAYS FOR TRYPANOSOMA CRUZI AND TRYPANOSOMA RANGELI. J INFECT DIS 1993; 168:1581-1584.

-WISON MARIANNA AND SCHANTZ PETER. "MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY" CHAPTER 67: NONMORPHOLOGIC DIAGNOSIS OF PARASITIC INFECTIONS; 1991, 719.

15) ESTABLECIMIENTO IMPORTADOR Y/O ELABORADOR. NOMBRE DEL DIRECTOR TECNICO, DOMICILIO LEGAL Y EN CASO DE PRODUCTOS IMPORTADOS TOTALMENTE TERMINADOS O FRACCIONADOS DEBERA CONSTAR EL ORIGEN DE ELABORACION (NOMBRE DE LA FIRMA Y DIRECCION)

Establecimiento elaborador: LABORATORIO IFI

Directora Técnica: Bioq. Liliana Roquel

Domicilio Legal: Chile 523 (1603) Villa Martelli - Buenos Aires

16) LEYENDA "PRODUCTO DE DIAGNOSTICO AUTORIZADO POR EL MINISTERIO DE SALUD Y ACCION SOCIAL, NUMERO"

Producto de diagnóstico autorizado por el Ministerio de Salud y Acción Social Nro.0796/02