

Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatała Chabén"

Guía de procedimientos





Ministerio de Salud

Dr. Ginés González García

Secretaría de Políticas, Regulación y Relaciones Sanitarias

Dra. Graciela Zulema Rosso

**Administración Nacional de Laboratorios
e Institutos de Salud “Dr. Carlos G. Malbrán”**

Dr. Gustavo Alberto Ríos

**INSTITUTO NACIONAL DE PARASITOLOGIA
“Dr. Mario Fatała Chabén”**

Dr. Andrés Mariano Ruiz

Departamento de Diagnóstico:

Dra. Ana María De Rissio - Dra. Miriam Marián García

Servicio de Docencia:

Lic. Raúl Conforti - Lic. Stella María López

Diseño gráfico:

D. G. Claudia Nosa

LEA ESTAS INDICACIONES ANTES DE COMENZAR

- Si opta por realizar el curso, deberá capacitarse como mínimo en dos de las tres técnicas que ofrecemos.
- La lectura de la “Guía de Procedimientos” deberá complementarla con el video; este le mostrará los movimientos adecuados (Gestos profesionales) en la ejecución del método. Para una mejor asimilación de las secuencias, luego de una primera lectura de los contenidos, reúna los materiales necesarios para realizar la técnica (sin utilizar sueros ni reactivos) para acompañar los movimientos que muestra el video.
- Complete el cuestionario de “Actividad” incluida en la “Guía de procedimientos”. Las preguntas que se incluyen tienen como finalidad que usted pueda interiorizarse sobre los procedimientos utilizados en el diagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi* que se realiza en su ámbito de trabajo.
- Una vez completa, deberá remitir a este Instituto, dentro de las fechas indicadas en el cronograma adjunto, la evaluación parcial para su corrección, adjuntando copia del cuestionario de “Actividad” con la información que obtenga.
- Contará con la asesoría de un profesional a quien podrá consultar si surgen dificultades para avanzar en su capacitación. Puede contactarse vía e-mail: docencia@inetex.com.ar. De no ser posible, al FAX: 011 4 331 7142 o mediante correo postal a: Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Faiala Chabán”, Servicio de Docencia, Av. Paseo Colón 568 (1063) Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
- Aprobada la evaluación, usted estará en condiciones de solicitar un segundo módulo, siendo el procedimiento idéntico al explicitado.
- Teniendo aprobadas las evaluaciones parciales, deberá concurrir a nuestro Instituto en fecha a acordar, según lo establece el cronograma para rendir una evaluación de la que dependerá la aprobación del curso.
- Con la aprobación de esta última instancia, le entregaremos un certificado otorgado por el Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Faiala Chabán”



Introducción

El laboratorio tiene gran importancia en el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*, ya que los cuadros clínicos encontrados en las fases agudas y crónicas, en muy pocos casos tienen signos patognomónicos.

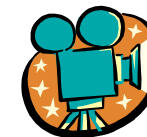
La demostración de la presencia del parásito constituye un diagnóstico de certeza de la infección. Sin embargo en la práctica sólo es posible detectar eficientemente la forma circulante del *T. cruzi* durante la fase aguda. En etapas posteriores el diagnóstico de laboratorio se apoya en la detección de elementos que señalen indirectamente la presencia de la infección, tales como antígenos parasitarios circulantes o, más comúnmente anticuerpos séricos. El resultado del inmunodiagnóstico es sólo indicativo de infección y no del estado clínico del paciente.

El diagnóstico de laboratorio de la infección de Chagas por *T. cruzi* es de fundamental importancia para:

- *El control y tratamiento de la Enfermedad de Chagas.*
- *El desarrollo de medidas de control de la epidemia.*
- *Detección de la transmisión vectorial.*
- *El seguimiento serológico de los niños de 2 a 14 años.*
- *La detección de la madre chagásica y el seguimiento del recién nacido.*
- *El control obligado de la sangre donada para transfusiones.*
- *El seguimiento de pacientes inmunosuprimidos y con trasplantes de órganos.*

La Normativa vigente, establece que para el estudio de pacientes en la **etapa aguda**, los métodos de diagnóstico recomendados son los *Parasitológicos* –que se detallarán en otro módulo- y para la etapa **indeterminada y crónica** los de elección son los *serológicos*. Los métodos parasitológicos no son los indicados en estas etapas por su baja sensibilidad que es menor al 50%.





El Inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas en nuestro país está reglamentado por una ley nacional (ver anexos) y puede efectuarse con dos criterios distintos:

- “Tamizaje o Screening”, para identificar anti-cuerpos en sangre de donantes para transfusiones o en estudios epidemiológicos. Son técnicas sensibles y rápidas. Los métodos más frecuentemente utilizados son : *Hemoaglutinación Indirecta* (HAI) y *Ensayo Inmunoenzimático* (ELISA), en los Títulos de Corte correspondiente para tamizaje o screening, según indique el productor del reactivo usado.
- “Confirmación” de manera mas precisa, cuando así lo exigen las necesidades clínicas o epidemiológicas.

En ambos casos el resultado se obtiene con un mínimo de dos técnicas serológicas normatizadas, siempre que hayan sido debidamente estandarizadas y validadas por el Centro de Referencia Nacional.

Los reactivos antigénicos en uso son de composición muy variada y ninguno alcanza por sí solo el 100% de efectividad en el diagnóstico. Sin embargo con el empleo de 2 reacciones serológicas se puede alcanzar un rango de *sensibilidad entre el 99 y 99,9%*.

Las *Duplas Serológicas* recomendadas son:

- HAI- IFI
- HAI – ELISA
- ELISA – IFI



El empleo de duplas serológicas permite combinar distintos antígenos y demostrar distintos anti-cuerpos en el suero del paciente. Si las dos reacciones efectuadas coinciden en sus resultados se puede certificar o descartar el diagnóstico de infección chagásica. Para aquellas muestras de reacciones discordantes, se debe solicitar nueva muestra y si la discordancia se repite se recurrirá al centro de referencia provincial o nacional para su confirmación.

Métodos Serológicos

A través de los métodos serológicos detectamos anticuerpos específicos generados en respuesta a la infección por *T. cruzi*. En todos los casos se determinan Inmunoglobulina humana, de tipo IgG y/o IgM. La utilidad de estos métodos y su aplicación van a depender de las diferentes situaciones epidemiológicas y diagnósticas.

Método de Hemaglutinación Indirecta Cuantitativa (HAI)

Para reactivos producidos por el INP

■ **Fundamento:** La Hemaglutinación Indirecta Cuantitativa (HAI) para Chagas se basa en la propiedad que tienen los anticuerpos del tipo IgG específicos contra los antígenos citoplasmáticos del *Trypanosoma cruzi* presentes en el suero del paciente, de producir una aglutinación cuando se ponen en presencia de glóbulos rojos sensibilizados con los antígenos de *Trypanosoma cruzi* de cultivo.

Indumentaria de Seguridad

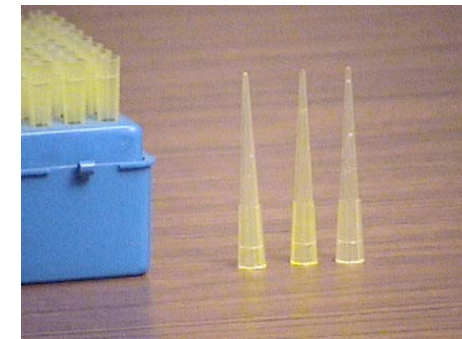
- Guardapolvo prendido y con brazos cubiertos.
- Guantes de látex.
- Máscara facial o Antiparras y barbijo.
- Zapatos cerrados.
- Cabello recogido o cofia.

Materiales

1. Policubetas de polipropileno de 96 pocillos de fondo en U, con tapas
2. Micropipeta automática monocal de 25 microlitros (25µl)*.
3. Micropipeta automática multicanal de 25µl - para diluciones-.*.
4. Cubeta (para la diluciones).
5. Tips (para pipeta de 25µl).
6. Recipiente con solución de hipoclorito de sodio (lavandina) al 10% o cloroxilenol al 30%.
7. Papel de filtro.
8. Algodón.
9. Marcador de fibra con tinta indeleble.
10. Cronómetro.
11. Matraces aforados de 1000ml, para preparación de Solución Buffer.

*En caso de no contar con pipetas automáticas mono y multicanal, realice la técnica con los siguientes materiales:

- microdiluidores de 25 ml.
- papel de calibración (para los microdiluidores).
- micropipeta gotero de 25 µl.
- recipiente para sumergir los microdiluidores.
- agua desionizada.



Reactivos

1. Suspensión antigénica¹ (lista para usar).
2. Solución salina estabilizadora (SSE) (ver preparación en anexos).
3. Sueros Testigos reactivos y no reactivos (ver preparación en anexos).
4. Sueros problemas.

Estabilidad y Conservación de los Reactivos:

*Los reactivos son estables hasta la fecha de vencimiento indicada en el frasco.

***Conservar en heladera (2° a 8°C) siempre en posición vertical.**

*No Congelar.

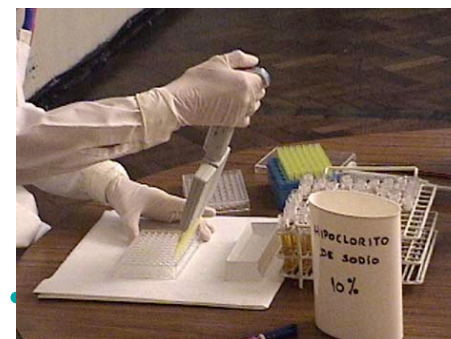
Desarrollo de la Técnica

Para comenzar a trabajar colóquese la indumentaria de bioseguridad. Disponga sobre la mesada de trabajo, previamente desinfectada con lavandina al 10% o cloroxilenol al 30%, los materiales y reactivos.

Los reactivos a utilizar deben estar a temperatura ambiente.

1. Utilice una de las policubetas para las muestras problemas. Colóquela en posición apaisada como muestra el video. Como podrá observar, las columnas están identificadas con números (del 1 al 12) y las filas con letras (A hasta H).
2. Utilizando el marcador, identifique, cada uno de los pocillos de la primera fila con el código (números, letras, etc.) que utilizó para individualizar los tubos que contienen los sueros de los pacientes a procesar.
3. A continuación tome la otra policubeta, que usará para los controles. De esta policubeta sólo utilizará las dos primeras filas (A y B). Identifique con el marcador la fila A como control positivo (+) y la B como control negativo (-)
4. Trabaje sobre la primera policubeta (muestras) colocando en todos los pocillos a utilizar, 25 µl de SSE, con pipeta automática multi o mono canal. Ej. Si procesa 7 sueros, utilizará las columnas 1 a 7 y las filas A hasta H.
5. Pase a la segunda policubeta (controles) y dispense en todos los pocillos de las filas A y B, 25 µl de SSE.
6. Vuelva a la policubeta de muestras problemas y agregue 25 µl del suero del primer tubo a procesar en el pocillo A1 (Dilución inicial). El mismo procedimiento deberá efectuarlo para el resto de los sueros en los pocillos correspondientes: A2, A3, A4, etc.

¹ Glóbulos rojos de ave, estabilizados con formol y sensibilizados con antígeno. -En caso de presentarse liofilizados, se debe resuspender en la solución estabilizadora 2 horas antes de su uso, mezclando por inversión.-



- 7) En los pocillos A1 y B1 de la policubeta de los controles, agregue 25 μ l del control reactivo y no reactivo respectivamente.

Diluciones:

- 8) **Policubeta de muestras problemas:** Con pipeta automática multicanal de 25 μ l homogeneice la muestra mediante carga y descarga (evitando la formación de espuma) por lo menos 5 veces. Transfiera 25 μ l del pocillo A1 al B1 (segunda dilución) y así sucesivamente hasta el pocillo H1, descartando los últimos 25 μ l.
- 9) Proceda de igual manera con las muestras restantes.
- 10) **Policubeta de controles:** Con pipeta automática multicanal de 25 μ l homogeneice el control positivo del pocillo A1, por carga y descarga (evitando la formación de espuma), por lo menos 5 veces y transfiera 25 μ l al pocillo A2 (segunda dilución) y así sucesivamente hasta el pocillo A12, descartando los últimos 25 μ l.
- 11) Del mismo modo al señalado en el punto anterior, proceda con el control negativo (fila B)
- Finalizada la técnica, habrá realizado las siguientes diluciones:
Para las muestras problemas en los pocillos A1: 1/2, B1: 1/4, C1: 1/8, D1: 1/16..... H1: 1/256.
Para los controles en los pocillos A1: 1/2, A2: 1/4, A3: 1/8, A4: 1/16..... A12: 1/4096.

Suspensión Antigénica:

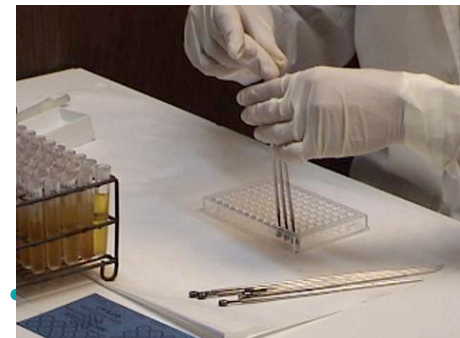
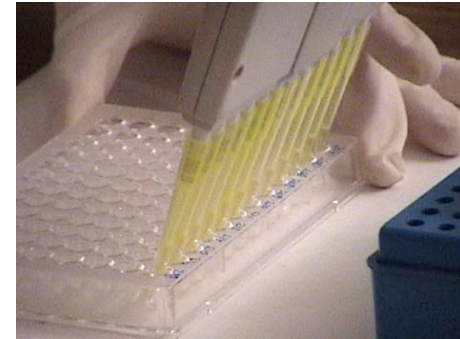
- 12) Coloque en todos los pocillos de ambas placas 25 μ l de la suspensión antigénica. La suspensión debe estar en constante agitación para evitar la autoaglutinación.

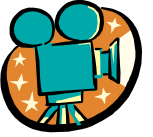
Agitación:

- 13) Mezcle, dando suaves golpes con la yema de los dedos, sobre los laterales de las policubetas de las muestras problemas y controles. Repita la operación con la otra policubeta.
- 14) Cubra las policubetas con sus respectivas tapas, dejándolas en reposo sobre una superficie plana, libre de vibraciones, durante una hora.

*** Recomendaciones para el uso de los microdiluidores**

- ✓ En caso de no contar con pipetas automáticas puede realizar la técnica utilizando microgoteros y microdiluidores (ver anexos).
- ✓ Si son nuevos deberá por única vez quemarlos a la llama hasta que el material se ponga incandescente, luego déjelos enfriar y colóquelos en agua desionizada.
- ✓ No frote el microdiluidor en el fondo del pocillo para no rayar la placa.
- ✓ Previo a su utilización compruebe que estén debidamente calibrados, utilizando papeles absorbentes marcados con círculos que permitan dispensar los 25 μ l requeridos.
- ✓ Antes de tomar la muestra con el microdiluidor, apóyelo sobre papel de filtro para descargar el volumen excedente y asegurar así una correcta toma de la misma.
- ✓ Al finalizar la dilución pase el microdiluidor sucesivamente por dos recipientes de agua destilada y finalmente apóyelos sobre papel de filtro antes de tomar una nueva muestra.





Lectura:

- 15) Luego de 60 minutos, proceda a la lectura sobre fondo blanco cuidando no mover las placas. Lea primero la placa de controles (reactivo y no reactivo).

■ Interpretación de los Resultados

- El **control reactivo** tiene un título de 1/256 y se manifiesta por la formación de un manto de bordes regulares que cubre el 50-100% del fondo del pocillo.
- El **control no reactivo** presenta la formación de un botón nítido por la sedimentación de la suspensión antigénica.
- Para Diagnóstico confirmatorio: se considera **reactivo** para anticuerpos del tipo IgG específico contra el *T. cruzi* aquellos sueros que tengan títulos iguales o mayores a 1/32.
- Para screening o tamizaje: la dilución de corte es 1/8.

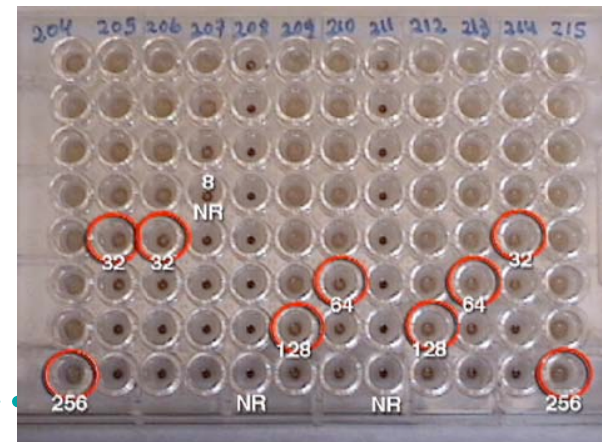
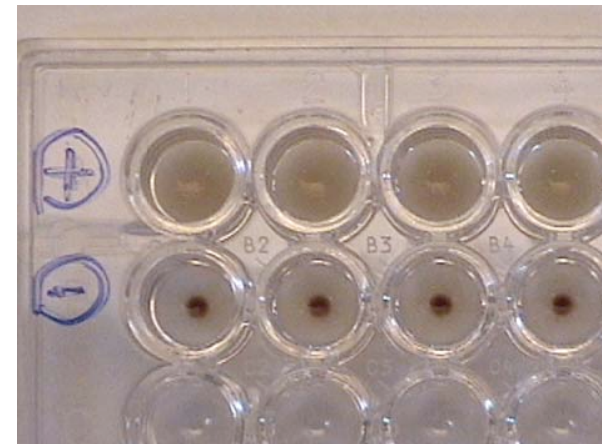
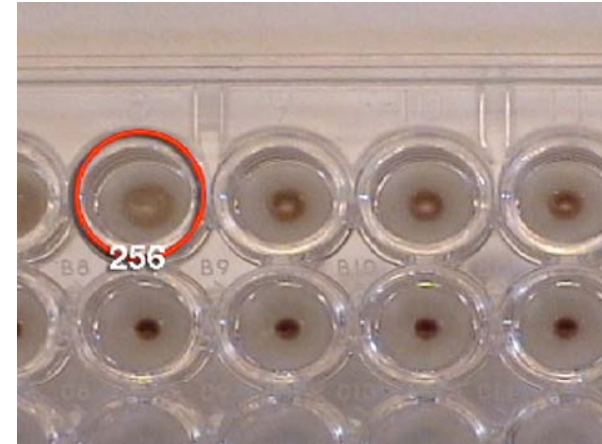
■ Consideraciones Generales:

Los procedimientos de laboratorio están sujetos a múltiples errores que deben ser detectados para poder corregirlos. Aún cuando una técnica es realizada más de una vez por un mismo operador, siguiendo la misma metodología, utilizando aparatos y reactivos iguales, las medidas no son idénticas.

Por consiguiente debe tener en cuenta los siguientes aspectos:

- No use policubetas recuperadas, pueden estar rayadas y/o contaminadas y modificarían la lectura.
- Elimine las cargas electrostáticas de la policubeta pasando un papel de filtro húmedo por su base antes de comenzar con las diluciones.
- Verifique que las pipetas automáticas mono y/o multicanal y de los microdiluidores, estén correctamente calibrados.
- **No congele el Antígeno** porque los glóbulos rojos se auto-aglutinarían. Si esto ocurre, debe descartarlo.
- Siempre compruebe la ausencia de aglutinación inespecífica utilizando un *ensayo testigo*²

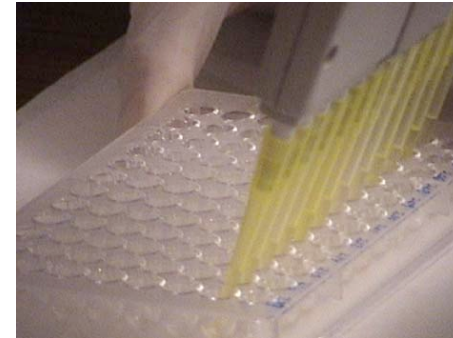
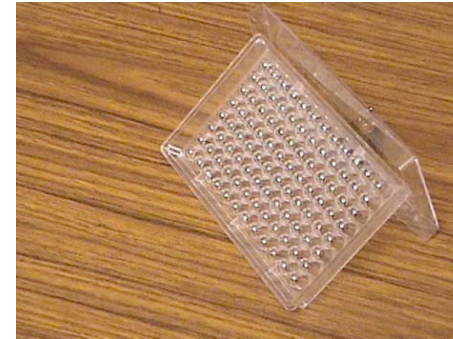
² Ensayo testigo: En la placa de los controles identifique otra fila como inespecífica, colocando SSE procediendo de la misma forma que cualquier muestra problema.



- Agite intensamente el frasco de antígeno, para asegurar una buena homogenización.
- Las condiciones del ensayo son críticas, debe controlar la calidad de la policubeta (donde se efectúa el ensayo), como así también la preparación y control del pH de la SSE.
- Respete el número de veces que tiene que homogenizar en la etapa de las diluciones de los sueros y controles.
- Evite vibraciones accidentales cuando la placa se encuentra en reposo, pues alteraría el desarrollo de la reacción.
- No adelante el tiempo de lectura estipulada.
- Incluya **siempre** control reactivo y no reactivo cuando procese las muestras problemas. Esto le permitirá verificar la reproducibilidad del ensayo, la estabilidad de los reactivos y posibles errores del operador.
- Realice las diluciones del mismo hasta título final (1/2 a 1/4096) si el suero pertenece a un recién nacido. De esta manera podrá confeccionar una curva serológica con todos los títulos obtenidos durante la etapa de seguimiento.
- Respete el título de corte que indique el productor si utiliza equipos comerciales.

Recuerde:

- ❖ La HAI como cualquier otra técnica serológica no puede ser considerada como único método para realizar el diagnóstico. Las Normas para el Diagnóstico de la infección Chagásica establecen utilizar como mínimo dos técnicas.
- ❖ Para que los resultados del diagnóstico sean confiables, debe efectuarse siguiendo técnicas estandarizadas y validadas, con operadores capacitados, utilizando reactivos controlados.
- ❖ Lleve siempre un registro de las lecturas de los controles reactivos y no reactivos.
- ❖ Decontamine la mesada de trabajo cada vez que termine de realizar la técnica utilizando hipoclorito de sodio al 10%.



durante 1 hora a temperatura ambiente



ANEXO

Normas Nacionales para el Diagnóstico de Infección por *T. cruzi*:

"En Argentina el diagnóstico de infección de Chagas esta regulado por la ley Nacional 22360, desde 1983. En cuya reglamentación se nombra al Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatala Chaben" como Centro de Referencia Nacional, a cargo de dictar las Normas Técnicas para la realización de este diagnóstico de Laboratorio en todo el territorio del país. Las mismas han sido revisadas y modificadas en 1996 y aprobadas por resolución ministerial 523/97."



Preparación de la solución salina estabilizadora (SSE)

Solución A	
Fosfato disódico deshidratado	53.72grs
Agua destilada c.s.p.	1000ml

Solución B	
Fosfato monopotásico anhidrido	20.41grs.
Agua destilada c.s.p.	1000ml

Solución buffer: (solución de trabajo)	
Solución A	72ml
Solución B	28 ml
Cl Na	8,5grs.
Agua destilada c.s.p.	1000ml

La solución buffer debe tener un pH 7,2 – 7,4. Fuerza iónica (1400 – 1600)

Conserve en heladera (4° - 8°C) en frasco color ámbar



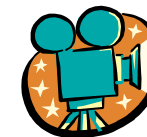
Preparación de los controles Reactivos y no reactivos

- Resuspenda el liofilizado en 1ml de agua destilada, homogenice y prepare 20 alícuotas de trabajo de 50 microlitros cada una.
- Utilice diariamente una alícuota de trabajo.
- Conserve en freezer a -20°, se mantiene estable por 6 meses.



Realización de la HAI con microgoteros y microdiluidores

1. Con un microgotero de 25 µl, coloque una gota de SSE en todos los pocillos a usar de las policubetas de muestras problemas y controles a usar.
2. Tome una alícuota de cada suero a procesar (25 µl) y homogenice la muestra por rotación del microdiluidor por lo menos 10 veces, para asegurar una correcta dilución de la misma.
3. Realice diluciones seriadas: pasando los microdiluidores al pocillo siguiente y así sucesivamente hasta la dilución que se desee investigar, rotando en cada paso el microdiluidor por lo menos 10 veces.
4. Coloque la suspensión antigénica con microgotero de 25 µl en todos los pocillos utilizados de las policubetas de las muestras problemas y controles.
5. Agite y proceda a la lectura de acuerdo con lo indicado en los puntos 13, 14 y 15 del desarrollo de la técnica.



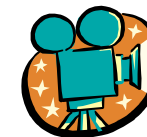
Actividad



La educación a distancia, permite el acceso a los programas de formación y actualización, sin que Usted se aparte de su propio ambiente, ni de su ambiente laboral, favoreciendo así la integración estudio-trabajo.

Para tener una visión de lo que se está haciendo en el diagnóstico de Chagas en su ámbito, le proponemos que responda a estas preguntas, investigando en su lugar de trabajo o en los centros asistenciales de su ciudad: para el diagnóstico de Chagas:

- a) ¿Cuántas técnicas utilizan?
- b) ¿Qué técnicas son? Serológicas o/y parasitológicas?
- c) ¿En qué casos se solicita el análisis de Chagas?
- d) En su rutina diaria, ¿Incorpora un suero con título conocido como control de la reacción, aparte de los controles del equipo?.
- e) Confeccione una planilla con la lectura de los controles reactivo y no reactivo.
- f) Enumere qué medidas de bioseguridad utiliza en el desarrollo de la técnica.
- g) A su criterio, ¿Qué modificaciones realizaría Ud. para mejorar el diagnóstico de Chagas?



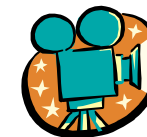
BIBLIOGRAFIA UTILIZADA

- Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud “ Dr. Carlos G. Malbran” Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatala Chabén” Manual de Diagnóstico en Parasitosis, Manual de laboratorio 1era. Edición 1999.-
- Boyden, S.V.: The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. S. Exp. Med. 93: 107 – 120 (1951).
- Cerisola, J.A.: La Prensa Médica Argentina 49/34: 1761 (1962).
- Storni, P. ; Bakos, E.; Bustamante. A.; Arbino, M.O.: Diagnóstico serológico de infección chagásica en pre-conscriptos de la clase 1959. Medicina (Buenos Aires). 39: 244-248 (1979).
- Fontenla, S.; Rossetti, E. Y Gonzalez, G. : 50° Triduo de la ABA, Huerta Grande (Cba.), (1985).
- Sáenz Alquezar, A.; Luquetti, A.O. and col.; Estudio multicéntrico: Avaliação do desempenho de conjuntos diagnóstico de hemaglutinação indirecta, disponíveis no Brasil, para o diagnóstico sorológico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Rev. Pat. Trp. 26 (2) : 343-374 (1997).
- Ministerio de Salud y Acción Social, INP “Dr. Mario Fatala Chabén” Normas para el diagnóstico de la infección chagásica. Resolución ministerial 523/97, (1998).



BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Knierim, F. y Saavedra, P.(1966): Técnica de la reacción de hemaglutinación aplicada al diagnóstico serológico de las parasitosis. Bol.Chil. Parasit., 21:39-44.
- Neal, R.A. and Miles, R.A. (1970): Indirect hemagglutination test for Chagas disease whith a simple method survey work. Rev. Inst. Med. Trop. S.Paulo, 12: 325 al 332.
- Vattuone, N. H., Szarfaman, A., González Cappa, SM.(1973): Antibodies Response and immunnoglobulin levels in Human with acute and chronic *Trypanosoma cruzi* Infections (Chagas Disease) J. Trop. Me. Hyg: 45.
- Lorenzo, L., Capriotti, G., Rojkin, F. (1991). Rev. Arg. Transf. XVII/1: 51.



Evaluación:

Práctico N° 1

1) Que métodos de diagnóstico emplearía para la etapa indeterminada o crónica?

Dé ejemplos

2) Por que se usan las duplas serológicas?

3) Utilizaría métodos parasitológicos para la etapa indeterminada o crónica?

Marque con una X lo que corresponda Si ☐ No ☐

Justifique

Práctico N° 2

1) Enumere posibles errores técnicos y operativos en la realización de la técnica HAI.

2) ¿Toda vez que Ud. realiza la Técnica HAI coloca los controles testigos?

Marque con una X lo que corresponda Si ☐ No ☐

Justifique

3 Marque con una X lo que corresponda. La suspensión antigénica la conserva a:

a) 4 -8°C ☐

b) -20°C ☐

Justifique