

CHAGACOR

ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO PARA LA INVESTIGACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA RECEPTORES A NEUROTRANSMISORES AUTONÓMICOS PARA DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DEL SÍNDROME DE DISAUTONOMÍA PERIFÉRICA EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.

Uso “In Vitro”. 96 determinaciones.

INTRODUCCION

Los pacientes chagásicos crónicos que desarrollan un Síndrome de Disautonomía Periférica que evoluciona hacia la patología cardíaca (miocarditis) y digestiva presentan en el suero anticuerpos contra receptores a neurotransmisores autonómicos. La presencia de los mismos marca el inicio de la enfermedad más tempranamente que el examen físico directo o instrumental hasta el momento existente.

Equipos de investigación han demostrado en abundantes trabajos científicos publicados en revistas internacionales, la presencia de factores inmunoglobulínicos capaces de reaccionar con receptores a neurotransmisores autonómicos con particular importancia fisiológica los comprometidos en la contractilidad cardíaca. Se evaluó cuali y cuantitativamente la presencia de inmunoglobulinas por métodos funcionales, inmunoquímicos e inmunobiológicos. Estos métodos de compleja operacionalidad para su uso clínico se correlacionaron entre sí con la sintomatología clínica del paciente y se generó así, un método inmunoserológico (ELISA) que tradujo los datos de los procedimientos anteriores haciéndolo apto para su utilización masiva.

Se calcula que en el mundo la infección Chagásica afecta a 6-7 millones de personas. Hasta un 30 % de enfermos crónicos, padecerían diferentes grados de cardiopatía. Este método (ELISA) permitiría masivamente inferir (diagnóstico), prever (pronóstico) y acompañar (evolución) las alteraciones neuroautonómicas cardíacas y no cardíacas (disautonomias), cuyo inicio no se puede establecer con otros métodos.

RESUMEN Y EXPLICACION DEL ENSAYO

CHAGACOR es un ensayo inmunoenzimático heterogéneo, no competitivo, basado en el método indirecto para la detección de anticuerpos contra receptores a neurotransmisores autonómicos.

Una dilución apropiada de los sueros se incubó en pocillos de microplacas de poliestireno, recubiertos con péptidos de receptores a neurotransmisores autonómicos seleccionados por su capacidad de inhibir la actividad inmunofarmacológica in vivo e in Vitro de los anticuerpos contra receptores cardíacos. Los anticuerpos anti-receptores son específicamente capturados, quedando unidos a la fase sólida. Luego de varios lavados, a fin de eliminar las inmunoglobulinas no capturadas, el sistema se incubó con anticuerpos monoclonales anti-IgG humana conjugados a peroxidasa. Este conjugado reacciona

específicamente con los anticuerpos anti-receptores inmunocapturados. El conjugado no unido se desecha por lavado y se revela la presencia de peroxidasa mediante el agregado de Peróxido de Hidrógeno/Tetrametilbencidina como sustrato cromogénico. Esta incubación da como resultado la aparición de un color azul cuya intensidad depende de la concentración y de la afinidad de los anticuerpos presentes en la muestra. La reacción enzimática es detenida mediante el agregado de ácido, lo que produce un viraje de color hacia el amarillo cuantificable espectrofotométricamente.

REACTIVOS Y MATERIALES PROVISTOS

- **Pocillos de reacción:** 96 pocillos cada una sensibilizados con un péptido de receptores a neurotransmisores autonómicos purificado, acondicionados en un contenedor y envasados en un sobre de polietileno metalizado conteniendo silicagel como desecante.
- **Control Positivo (+):** un frasco conteniendo 0.2 ml de una dilución de suero reactivo para anticuerpos anti-receptores a neurotransmisores autonómicos, inactivado, de bajo título, con estabilizadores proteicos (Listo para usar).
- **Control negativo (-):** un frasco conteniendo 0.2 ml de una dilución de suero no reactivo para anticuerpos anti-receptores a neurotransmisores autonómicos, inactivado, con estabilizadores proteicos (Listo para usar).
- **Solución para lavado 25X:** un frasco conteniendo 50 ml de solución amortiguadora, con conservadores (concentrado 25 veces).
- **Frasco lavador:** un frasco gotero vacío para preparar la solución de lavado.
- **Conjugado:** un frasco conteniendo 5 ml de solución de anticuerpos monoclonal anti-IgG humana marcado con peroxidasa, con estabilizadores proteicos. Listo para usar.
- **Sustrato Peróxido:** un frasco conteniendo 5 ml de solución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) tamponado. Listo para usar.
- **Cromógeno TMB:** un frasco conteniendo 5 ml de 3,3', 5,5' Tetrametilbencidina (TMB). Listo para usar.
- **Diluyente de muestras:** un frasco conteniendo 30 ml de solución salina proteica con conservador. Agitar antes de usar.
- **Solución Stop:** un frasco conteniendo 30 ml de una solución de Acido Sulfúrico 1M. Listo para usar.
- 1 instructivo.

ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

Los reactivos son estables hasta la fecha que figura en la caja y frascos.

Guardar los componentes del kit entre 2 y 8° C, siempre en posición vertical.

Una vez abierto el sobre con los pocillos de reacción deben extraerse los necesarios para los tests en curso y cerrar herméticamente el sobre con los restantes, conservando el desecante en su interior.

MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

- Agua destilada o desionizada
- Material volumétrico de vidrio
- Incubador termostatzado a 37° C.
- Pipetas para medir 10, 100 y 200 µl con puntas descartables.
- Lector de ELISA de longitud de onda única 450 nm ± 5 nm o longitud de onda doble 450 nm ± 5 nm y 650 ± 5 nm (de uso alternativo),
- Sistema de aspiración/lavado de microplacas con recipiente colector de desechos (de uso alternativo).
- Cronómetro
- Materiales de Bioseguridad
- Cinta adhesiva para obturar los pocillos

OBTENCION Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Emplear suero fresco y límpido.

La sangre se extraerá de un paciente preferentemente en ayunas, siguiendo las normas generales, recogiéndola en tubos de centrifuga. Para obtener el suero dejar coagular la sangre, centrifugar y separar el sobrenadante. Las muestras se emplean sin diluir y pueden conservarse entre 2 y 8° C hasta 48 hs., o congeladas a -20° C para un almacenamiento prolongado. Deben evitarse los congelamientos/descongelamientos repetidos.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Tanto los reactivos provistos con el kit como las muestras de suero humano deben ser consideradas como potenciales portadores de agentes infecciosos, por lo que se recomienda extremar las precauciones en la manipulación de las mismas observando las normas de Bioseguridad.

- No pipetear con la boca.
- No fumar, comer o beber en lugar de trabajo.
- Usar guantes para manipular los componentes del kit y muestras.
- Evitar las salpicaduras.
- Descontaminar los materiales utilizados. El mejor método para descontaminar los materiales y soluciones es la esterilización en autoclave durante por lo menos 1 hora a 121,5°C. Alternativamente puede realizarse la inactivación por tratamiento con hipoclorito de sodio al 5% durante 30 minutos.
- No utilizar los componentes del kit después de la fecha de caducidad.
- No mezclar reactivos de diferentes lotes.
- Dejar que los reactivos alcancen la temperatura ambiente antes de su uso. Una vez utilizados taparlos inmediatamente para evitar contaminación y almacenarlos entre 2 y 8°C.
- No intercambiar las tapas entre los diferentes lotes.
- Sólo para uso diagnóstico “In Vitro”.

PREPARACION DE LOS REACTIVOS

- **Pocillos de Reacción:** Están listos para usar y son estables hasta la fecha de caducidad indicada en el kit, conservadas entre 2 y 8°C en el envase provisto, perfectamente cerrado y con el desecante. En caso de usar menos de 8 pocillos, separarlos unitariamente quebrando la tira y ubicarlos en el soporte.
- **Diluyente de Muestras:** agitar antes de usar.
- **Solución para Lavado:** diluir una parte del contenido del frasco Solución para Lavado 25X en 24 partes de agua destilada.
Si se utiliza el Frasco lavador agregar en el mismo 2,4 ml de la Solución para Lavado 25X y completar con agua destilada hasta la marca que indica 60 ml. Homogeneizar bien. La solución así preparada es estable > 1 mes a temperatura ambiente.

INSTRUCCIONES DE LAVADO

Un buen procedimiento de lavado es fundamental para una significativa validación analítica de los resultados, eliminar falsa positividad y ruido de fondo.

Si consigue usar un lavador de microplacas de buena calidad (SLT, FLOW, etc.) realice como mínimo 4-6 ciclos de lavado automático empleando > 0,3 ml/pocillo de solución para lavado con un reposo de 20-40 segundos.

En el caso de lavado manual, emplee el frasco lavador y efectúe como mínimo 4-6 ciclos de lavado dispensando y aspirando > 0,3 ml/pocillo por ciclo con reposo de 20-40 segundos.

Para lograr la aspiración manual puede ayudarse con una bomba de vacío o pipeta Pasteur con tetina.

Descartar el eluato sobre una solución de hipoclorito de sodio al 5%.

Finalizados los ciclos de lavado elimine el líquido residual invirtiendo los pocillos y golpeándolos sobre papel absorbente.

PROCEDIMIENTO

1. Colocar los pocillos de reacción en el contenedor previsto considerando la cantidad de determinaciones a realizar, más dos controles negativos y un control positivo.
2. Agregar en los pocillos correspondientes 0,2 ml de Diluyente de Muestras (Ver Preparación de los Reactivos).
3. Dispensar con una micropipeta exactamente 10 µl de las muestras a estudiar en el pocillo que contiene el Diluyente agregado anteriormente.
Homogeneizar bien por carga y descarga de la micropipeta.
Repita lo mismo con cada muestra de suero. Control Negativo (-) por duplicado y Control Positivo (+).
4. Homogeneizar bien toda la policubeta por movimientos circulares o pequeños golpes laterales, durante 10 segundos.
5. Obturar los pocillos con cinta adhesiva e incubar a 37°C durante 20 minutos.
6. Descartar el contenido TOTAL de los pocillos por inversión o aspiración y lavarlos con Solución para Lavado (ver Preparación de Reactivos) según las Instrucciones expresadas anteriormente.

7. Seguidamente agregar a cada pocillo una gota (50 µl) del Conjugado.
8. Homogeneizar bien toda la policubeta por movimientos circulares o pequeños golpes laterales, durante 10 segundos.
9. Obturar los pocillos con cinta adhesiva e incubar a 37°C durante 20 minutos.
10. Descartar por inversión o aspiración el Conjugado y lavar como se indicó en el punto 6.
11. Agregar a cada pocillo una gota (50 µl) de Sustrato Peróxido y a continuación una gota (50 µl) de Cromógeno TMB. Homogeneizar como se indicó en el punto 4 e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente y oscuridad.
12. Frenar inmediatamente la reacción enzimática con el agregado de 2 gotas (100 µl) de Solución Stop, homogeneizar como se indicó en el punto 4 y medir la densidad óptica a 450 nm con un lector de ELISA, empleando blanco de aire, dentro de los 30 minutos de agregada la solución.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Luego del agregado de la Solución Stop, homogeneizar como se indicó en el Punto 4 y medir la densidad óptica (D.O.) de cada pocillo a 450 nm, empleando blanco de aire dentro, de los 30 minutos de agregada la solución. La presencia o ausencia de anticuerpos anti Receptores a neurotransmisores autonómicos deben ser analizada teniendo en cuenta el límite de decisión (cut off value).

Es recomendable utilizar dos o más pocillos para el Control Negativo.

Un ensayo se considera válido si la D.O. promedio de los Controles Negativos es menor a 0.400 y la D.O. del Control Positivo es mayor o igual que el cut-off. Si estas condiciones no se cumplen repetir la corrida.

Límite de decisión o cut off value: D.O. promedio del Control Negativo + 0.200

Una prueba es considerada no reactiva si su valor de DO es menor que el valor límite de decisión.

Una prueba es considerada reactiva si su valor de DO es igual o mayor que el límite de decisión.

CONSIDERACIONES SOBRE LOS RESULTADOS

El método permitiría clasificar a los pacientes infectados por Trypanosoma cruzi asintomáticos en dos grupos de riesgo para adquirir el Síndrome de Disautonomía Periférica que evoluciona hacia la patología cardíaca (miocarditis) y/o digestiva:

Bajo riesgo ELISA no reactivos

Alto riesgo ELISA reactivos

CONCLUSIONES

Toda muestra que ha sido reactiva en una primera prueba deberá ser ensayada nuevamente para su confirmación. Si el resultado es negativo en el segundo ensayo, la muestra se considerará no reactiva. Resultados no reproducibles en su reactividad pueden deberse a algunas de las siguientes causas:

- Lavado incorrecto de los pocillos
- Contaminación de una muestra no reactiva con una muestra reactiva adyacente.
- Contaminación de los Substratos Peróxido y Cromógeno TMB con agentes oxidantes (como por ejemplo Cloro).
- Mal dispensado y homogeneizado de las muestras.

LIMITACIONES DEL METODO

El método (ELISA) establece una entidad fisiológica entre las Igs-Ac/receptor (antígeno) que permite: (a) definir la presencia de Igs-Ac en los pacientes; (b) caracterizar la actividad biológica en músculo vivo de las Igs-Ac y (c) seleccionar el método más específico para valorar las Igs-Ac. Estas premisas son los requisitos y exigencias del método para correlacionar la clínica, la experimentación biológica y las técnicas de laboratorio de interacción primaria. La integración Igs-ac/receptor (antígeno) es condición necesaria pero no suficiente si no se convalida la clínica del paciente con los efectos fisiofarmacológicos de interacción primaria.

CARACTERISTICAS DE DESEMPEÑO DEL PRODUCTO

La reactividad del Chagacor fue determinada por estudio de muestras provenientes de pacientes clínicamente caracterizados para la Enfermedad de Chagas y para anticuerpos contra Receptores a neurotransmisores autonómicos por métodos biológicos. Tabla 1 y 2.

Tabla 1

Grupo clínico	Método Biológico %	Chagacor %
Chagásicos Asintomáticos con Disautonomía	97	98
Chagásicos Asintomáticos sin Disautonomía	26	25
Chagásicos Cardiópatas con Disautonomía	98	99
Chagásicos Cardiópatas sin Disautonomía	4	5
Control (no Chagásicos)	1	1

Tabla 2

Grupo clínico	Método Biológico %	Chagacor %
Chagásicos con acalasia	93	89
Chagásicos sin acalasia	23	27
Control (no Chagásicos)	3	0

La reproducibilidad del Chagacor por determinación del coeficiente de variación Intraensayo e interensayo es menor o igual que 20 %.

BIBLIOGRAFIA

- 2000. L. Sterin-Borda and E. Borda. Annals New York Academy of Sciences 917: 273-280. Role of Neurotransmitter Autoantibodies in the Pathogenesis of Chagasic Peripheral Dysautonomia.
- 1997. JC Goin, C. Perez Leiros, E. Borda, L. Sterin-Borda. FASEB J 10: 77-83. Interaction of human chagasic IgG with the second extracellular loop of the human heart mAChRs. Functional and Pathological Implications..
- 1997. C. Perez Leiros, L. Sterin Borda, E. Borda, J.C. Goin, M. Hosey. J. Biol. Chem. 272: 12989-93. Desensitization and sequestration of human M2 mAChRs by autoantibodies from patients with Chagas Disease.
- 1997. L. Sterin Borda, A. Genaro, C. Perez Leiros, G. Cremaschi, A. Vila Echague, E. Borda, J. Mol. Cell. Cardiol. 29: 1851-1865. Participation of nitric oxide system in the cardiac muscarinic cholinergic effect of human chagasic IgG.
- 1996. L. Sterin Borda, A. Genaro, JC Goin, G. Cremaschi, A. Vila Echague, E. Borda. Mol. Cell. Biochem. 160/161: 75-82. Involvement of nitric oxide synthase and PKC activation on chagasic antibodies action upon cardiac contractily.
- 1996. JC Goin, C. Perez Leiros, E. Borda, L. Sterin Borda. Medicina 56: 699-704. Interaction the anticuerpos con el tercer dominio celular del receptor muscarínico humano. Implicancias funcionales y patológicas.
- 1994. JC Goin, E. Borda, C. Perez Leiros, R. Storino, L. Sterin Borda. J. Aut. Ner. Syst. 47: 45-52. Identification of antibodies with muscarinic cholinergic activity in human Chagas disease: pathological implications.
- 1994. JC Goin, E. Borda, C. Perez Leiros, E. Borda, L. Sterin-Borda. Mol. Neuropharmacol 3: 189-196. Human chagasic IgG and muscarinic cholinergic activity in human Chagas disease: pathological implications.
- 1990. C. Perez Leiros, L. Sterin-Borda, P. Cossio, E. Borda. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 195: 356: 363. Muscarinic cholinergic antibodies in experimental autoimmune myocarditis regulates cardiac function.

LABORATORIO LEMOS S.R.L.

Director Técnico: Jorge O. Carradori. Bioquím. y Farm.

Santiago del Estero 1162

C1075AAX. C.A.B.A. Argentina

Telefax: (5411) 4304-2204/2374

E-mail: info@lab-lemos.com

www.lab-lemos.com

Autorizado por A.N.M.A.T. Certificado N° 004183.

USO PROFESIONAL-VENTA EXCLUSIVA

A LABORATORIOS DE ANÁLISIS CLÍNICOS.

Industria Argentina