

MS 10310030064

Imuno-Elisa

CHAGAS

Kit para determinação qualitativa e semi-quantitativa de anticorpos IgG anti-Trypanosoma cruzi no soro humano, por enzimaímunensaio (ELISA) usando antígeno recombinante.

CÓD. 44096-E: 96 determinações

CÓD. 440192-E: 192 determinações



WAMA Diagnóstica

Rua Aldo Germano Klein, 100 - CEAT

CEP 13560-971 - São Carlos - SP

Fone (16) 3377.9977 / Fax (16) 3377.9970

www.wamadiagnostica.com.br

Imuno-Elisa CHAGAS

IMPORTÂNCIA CLÍNICA

A doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana é uma infecção endêmica, de evolução essencialmente crônica, causada por um protozoário, o *Trypanosoma cruzi*, e transmitida ao homem por um inseto, o triatomíneo.

Imunologicamente, 3 estágios podem ser considerados: agudo, latente ou indeterminado e crônico. Na fase aguda, verificam-se febre, miocardiopatia, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia e parasitemia. A multiplicação intracelular dos parasitas nos músculos lisos e estriados e células do sistema retículo endotelial acarretam a formação de pseudocistos. Na fase intermediária ou latente não há sintomas. A doença pode evoluir para a fase crônica com sinais de miocardiopatia, degeneração das células ganglionares do sistema nervoso central e periférico, e hipertrofia e dilatação de certos órgãos, tais como esôfago e cólon, constituindo os mega.

Pelos altos índices de prevalência e morbidade ela se tornou um dos maiores problemas de saúde pública em toda a América Latina.

Como a minoria dos indivíduos com sorologia positiva para *T. cruzi* desenvolve evidências clínicas da doença crônica, as informações prestadas pelo laboratório clínico tornam-se decisivas no diagnóstico etiológico.

Vários são os métodos utilizados para o diagnóstico da doença de Chagas: reação de fixação de complemento, aglutinação, precipitação, imunofluorescência, hemaglutinação e imunoenzimático.

Destes, os mais utilizados são as reações de hemaglutinação indireta (HAI) e as reações de imunofluorescência indireta (IFI).

Atualmente, os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) vem sendo cada vez mais utilizados pela facilidade de execução, ótima sensibilidade e especificidade, e possibilidade de automação.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

As cavidades da placa de microtitulação são cobertas com antígeno recombinante do *Trypanosoma cruzi* altamente purificado. Anticorpos específicos anti-*Trypanosoma cruzi* presentes no soro ligam-se a esses antígenos. O material não ligado é retirado por lavagem e uma antigamaglobulina anti-IgG humana marcada com peroxidase é aplicada a reação. Este conjugado liga-se aos anticorpos específicos IgG humanos

anti-*Trypanosoma cruzi* ligados ao antígeno da placa. O material não ligado é novamente retirado por lavagem e adicionado um substrato (TMB) que desenvolverá cor nas cavidades onde a enzima (peroxidase) estiver presente, indicando a presença de anticorpo humano anti-*Trypanosoma cruzi*. A reação enzimática é parada pela adição de uma solução stop e a absorbância é medida a 450 nm. A concentração de anticorpo IgG específico é diretamente proporcional a intensidade da cor da reação.

APRESENTAÇÃO DO KIT

CÓD. 44096-E - 96 determinações

1. Microplaca com cavidades cobertas com antígeno recombinante do *Trypanosoma cruzi* (12 x 8 cavidades)
2. Solução diluente "laranja" (1 x 100ml)
3. Tampão de lavagem - 20 X concentrado (1 x 50 ml)
4. Conjugado anti-IgG humana marcado com peroxidase (11ml)
5. Substrato cromogênico (TMB) (11ml)
6. Solução stop (11ml)
7. Soro controle negativo (2ml)
8. Soro controle positivo baixo (2,5ml)
9. Soro controle positivo alto (2ml)
10. Instruções para uso

CÓD. 440192-E - 192 determinações

1. Microplaca com cavidades cobertas com antígeno recombinante do *Trypanosoma cruzi* (24 x 8 cavidades)
2. Solução diluente "laranja" (2 x 100ml)
3. Tampão de lavagem - 20 X concentrado (2 x 50ml)
4. Conjugado anti-IgG humana marcado com peroxidase (2 x 11ml)
5. Substrato cromogênico (TMB) (2 x 11ml)
6. Solução stop (2 x 11ml)
7. Soro controle negativo (2 x 2ml)
8. Soro controle positivo baixo (2 x 2,5ml)
9. Soro controle positivo alto (2 x 2ml)
10. Instruções para uso

MATERIAL NECESSÁRIO, MAS NÃO FORNECIDO

- Micropipetas
- Água destilada ou deionizada para diluição do tampão de lavagem.
- Incubador com temperatura de 37°C.

- Leitor de microplaca com filtro de 450 nm.
- Papel absorvente.
- Recipiente para descarte de material.

PREPARAÇÃO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

• **MICROPLACA (1):** estável até a data do vencimento se conservada entre 2-8°C. Retirar do envelope a quantidade de tiras que serão usadas e deixá-las atingir a temperatura ambiente (20-25°C). Manter no envelope laminado com dessecante e entre 2-8°C as tiras que não forem utilizadas.

• **SOLUÇÃO DILUENTE (2):** estável até a data do vencimento se conservada entre 2-8°C. Será utilizada para diluir as amostras de soro dos pacientes a 1/25. Após diluídas, as amostras devem ser usadas dentro de 8 horas. **Não congelar.** Contém *Proclin 300 a 0,05 % como conservante. Deixar atingir a temperatura ambiente (20-25°C) antes de usar.

• **TAMPÃO DE LAVAGEM (3):** diluir o tampão de lavagem concentrado usando 1 parte do tampão com 19 partes de água destilada ou deionizada. Durante cada ciclo de lavagem, cada cavidade deve ser completada com aproximadamente 300µl. O tampão de lavagem diluído é estável por 4 semanas entre 2-8°C. Contém *Proclin 300 a 0,05% como conservante. Deixar atingir a temperatura ambiente (20-25°C) antes de usar.

• **CONJUGADO ANTI-IgG HUMANA MARCADO COM PEROXIDASE (4):** pronto para uso. Estável na geladeira entre 2-8°C até a data do vencimento. **Não congelar.** Contém *Proclin 300 a 0,05% como conservante. Deixar atingir a temperatura ambiente (20-25°C) antes de usar.

• **SUBSTRATO CROMOGÊNICO (TMB) (5):** pronto para uso. Estável na geladeira entre 2-8°C até a data de vencimento. **Não congelar.** Contém *Proclin 300 a 0,05% como conservante. Deixar atingir a temperatura ambiente (20-25°C) antes de usar. O TMB não é mutagênico e carcinogênico.

• **SOLUÇÃO STOP (6):** pronto para uso. É ácido clorídrico (HCl) e, portanto, corrosivo. Manusear com cuidado. Em caso de contato com a pele lavar abundantemente em água corrente. Deixar atingir a temperatura ambiente (20-25°C) antes de usar. Estável até a data do vencimento.

• **SORO CONTROLE NEGATIVO (7):** pronto para uso. Usar puro, ou seja, não diluído. Conservar em geladeira entre 2-8°C até a data do vencimento. Contém *Proclin 300 a 0,05% como conservante.

• **SORO CONTROLE POSITIVO BAIXO (8):** pronto para uso. Usar puro,

ou seja, não diluído. Conservar em geladeira entre 2-8°C até a data do vencimento. Contém *Proclin 300 a 0,05% como conservante. **Deve ser usado em duplicata para checar a performance do teste e determinar o valor do cut-off.**

• **SORO CONTROLE POSITIVO ALTO (9):** pronto para uso. Conservar em geladeira entre 2-8°C até a data do vencimento. Contém *Proclin 300 a 0,05% como conservante.

* Proclin 300 é marca registrada pertencente a ROHM&HAAS Limited.

AMOSTRAS

Usar amostra de soro livre de hemólise, lipemia e contaminação. Amostra de plasma colhida com EDTA, heparina ou oxalato pode interferir com o procedimento do teste e deve ser evitada.

O soro pode ser conservado em geladeira entre 2-8°C por 48 horas. Para um tempo maior, deve ser guardado no freezer a -20°C por até 1 ano. Amostras congeladas devem ser homogeneizadas antes do teste. Evitar formação de espuma. Não usar azida sódica como conservante, pois esta pode inibir a enzima peroxidase.

Após diluir o soro com a solução diluente usar em 8 horas.

Evitar repetidos congelamentos e descongelamentos, pois isto causará falsos resultados.

DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS

Diluir os soros a serem testados a 1:25;

Em tubo

20 μ l do soro + 480 μ l da solução diluente. Usar dentro de 8 horas. Dispensar 125 μ l das amostras diluídas a 1:25 nas cavidades da placa.

Na placa

5 μ l do soro + 120 μ l da solução diluente e proceder o teste conforme técnica descrita.

CONTROLE

Os controles devem ser incluídos para garantir precisa interpretação dos resultados. Os controles estão prontos para uso, **e não devem ser diluídos**, usar diretamente na placa conforme plano estabelecido de distribuição.

PROCEDIMENTO

1. De acordo com o plano estabelecido de distribuição na placa, usar 1 cavidade para o soro controle negativo (7), 1 cavidade para o soro controle positivo alto (9) e 2 cavidades para o soro controle positivo baixo (8), o qual

determinará o ponto de corte (cut-off).

2. Dispensar 125 μ l dos controles e amostras diluídas 1:25 caso tenha utilizada técnica de diluição em tubo. Homogeneizar levemente, batendo com os dedos nas bordas da placa ou por vibração mecânica por 15 segundos.

3. Cobrir a placa com folha adesiva, coloca-la sobre papel absorvente úmido e incubar a 37°C por 60 minutos.

4. Descartar o conteúdo da placa dentro de um recipiente contendo solução desinfetante.

5. Lavar a placa 3 vezes com tampão de lavagem diluído (3) (vide Preparação e Estabilidade dos Reagentes). Encher e esvaziar seguidamente as cavidades com aproximadamente 300 μ l de tampão de lavagem. Recomenda-se o uso de uma lavadora de microplaca manual ou automática.

6. Após a última lavagem, inverter a placa e batê-la sobre papel absorvente para remover todo o líquido residual.

7. Dispensar 100 μ l do conjugado (4) em cada cavidade da microplaca. Homogeneizar levemente, batendo com os dedos nas bordas da placa ou por agitação mecânica (agitador de placa) por 15 segundos.

8. Cobrir a placa com folha adesiva, colocá-la sobre papel absorvente úmido e incubar a 37°C por 30 minutos.

9. Repetir as etapas 4, 5 e 6.

10. Dispensar 100 μ l de substrato cromogênico (5) em cada cavidade da microplaca. Homogeneizar levemente, batendo com os dedos nas bordas da placa ou por agitação mecânica (agitador de placa) por 15 segundos.

11. Incubar a placa a 37°C, sobre uma superfície seca, por 15 minutos, **protegida da luz.**

12. Bloquear a reação dispensando 100 μ l da solução stop (6) em cada cavidade da microplaca. Homogeneizar levemente, batendo com os dedos nas bordas da placa ou por agitação mecânica (agitador de placa) por 30 segundos, assegurando que a cor azul mude completamente para amarelo.

13. Ler **IMEDIATAMENTE** após o bloqueio da reação em um leitor de microplaca com filtro de 450nm.

IMPORTANTE:

• O procedimento de lavagem é crítico para o desempenho do teste.

Lavagens insuficientes resultarão leituras pouco precisas ou absorbâncias falsamente elevadas.

- A realização dos testes em duplicata, embora não obrigatória, é recomendada.
- O tempo gasto para pipetagem das amostras e controles não deve exceder 30 minutos.

RESUMO DO PROCEDIMENTO

1. Diluir o soro 1:25 (20 μ l do soro + 480 μ l da solução diluente (2));
2. Pipetar 125 μ l do soro diluído e dos controles em cada cavidade da placa;
3. Homogeneizar por 15 segundos e Incubar a 37°C por 60 minutos;
4. Descartar o conteúdo da placa e lavar 3 vezes com tampão de lavagem (3);
5. Pipetar 100 μ l do conjugado (4) em cada cavidade da placa;
6. Homogeneizar por 15 segundos e Incubar a 37°C por 30 minutos;
7. Descartar o conteúdo da placa e lavar 3 vezes com tampão de lavagem (3);
8. Pipetar 100 μ l do substrato cromogênico (5) em cada cavidade da placa;
9. Homogeneizar por 15 segundos e Incubar no escuro a 37°C por 15 minutos;
10. Pipetar 100 μ l da solução stop (6) em cada cavidade da placa;
11. Homogeneizar por 30 segundos;
12. Ler a densidade óptica em um leitor de microplaca com filtro de 450nm.

CÁLCULOS DOS RESULTADOS

Determinar para cada teste e soro controle a densidade óptica (DO).

Cut off = Média das DO do Soro Controle Positivo Baixo

1,5

Validação do Ensaio: A média da DO do Soro Controle Positivo Baixo deverá ser 3 vezes maior do que a DO do Soro Controle Negativo.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

RESULTADO REAGENTE: D.O. da amostra maior que o *borderline* (zona duvidosa).

RESULTADO DUVIDOSO (*Borderline*): D.O. da amostra menor que a D.O. do soro controle positivo baixo, mas maior que o valor do *Cut-off*. Esta é a chamada zona duvidosa.

RESULTADO NÃO REAGENTE: D.O. da amostra menor que o *Cut-off*.

DESEMPENHO DO TESTE

Foram realizados testes para determinar a sensibilidade e especificidade do Imuno Elisa Chagas da Wama Diagnóstica. Utilizamos 120 amostras solidamente positivas e não foram encontrados resultados falso negativo, conferindo ao Imuno Elisa da Wama Diagnóstica uma sensibilidade de 100% no teste de especificidade, utilizamos 642 amostras verdadeiramente negativas e não foram encontradas resultados positivos, conferindo uma especificidade ao Imuno Elisa Chagas da Wama Diagnóstica de 100%.

LIMITAÇÕES DE USO

Para a correta interpretação dos resultados os dados clínicos do paciente devem sempre ser considerados. Recomenda-se também para uma maior segurança na interpretação dos resultados sorológicos para a doença de Chagas a utilização de mais de um método de análise. A **WAMA** produz o **ImunoCon CHAGAS** (Cod. 1460-I, 14100-I, 14200-I) por imunofluorescência indireta e o **Imuno-HAI CHAGAS** (Cod. 34096-H, 34192-H, 34380-H) por hemaglutinação indireta.

PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS

1. Os reagentes devem ser conservados entre 2 - 8°C.
2. A data de validade corresponde ao último dia do mês assinalado nos rótulos dos frascos e da caixa do kit.
3. Deve ser evitado expor os reagentes a temperaturas elevadas, bem como diretamente ao sol.
4. Não congelar qualquer reagente, pois isto causará deterioração irreversível.
5. Os reagentes contém Proclin 300 a 0,05% como conservante, o qual pode ser tóxico se ingerido. No caso de contato com a pele, lavar abundantemente em água corrente.
6. O **Imuno-ELISA CHAGAS da WAMA** contém materiais de origem humana, os quais foram testados, com resultados negativos para anticorpos anti-HIV I e II e anti HCV antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg). Porém, como nenhum método diagnóstico oferece completa segurança da ausência destes e de outros agentes infecciosos, recomenda-se tratar todos os reagentes como materiais potencialmente infecciosos, bem como ter o mesmo cuidado no descarte destes materiais.
7. Não utilizar reagentes ou microplacas de lotes diferentes.
8. Deixar os reagentes adquirir a temperatura ambiente (20 - 25°C) antes de

iniciar os testes.

9. Os reagentes devem ser homogeneizados levemente por inversão e tampados imediatamente após o uso.

10. Não deixar as cavidades da microplaca secar durante o ensaio.

11. Evitar repetidas pipetagem dos reagentes estoques, pois isso pode causar contaminação.

12. As amostras a serem testadas e os controles devem ser utilizados ao mesmo tempo para manter as mesmas condições do teste.

13. Não usar reagentes após a data de validade.

14. Utilizar as Boas Práticas de Laboratório (BPLs) na conservação, manuseio e descarte dos materiais.

SIMBOLOGIA



O conteúdo é suficiente para (n) testes



Data limite de utilização



Limite de temperatura



Consultar instruções para uso



Produto diagnóstico *in vitro*



Número do lote



Número do catálogo



Proteger do calor

BIBLIOGRAFIA

1. Büllow, L. and Lindbladh, C.: Recombinant techniques in the preparation of protein conjugates. In: **Bioconjugation**. Macmillan reference, 1998.
2. Carbonetto, C. H. et al.: Estudos serologicos em pacientes com enfermidade de Chagas crônica. **Medicina** (Buenos Aires), 43: 131-136, 1983.
3. Crowther, J. R.: ELISA: Theory and Practice. **Humana Press**, 1995.
4. Fuchs, A. P. et al.: Diagnóstico sorológico na doença de Chagas: estudo comparativo de diferentes técnicas. **R. Inst. Méd. Trp. S. Paulo**, 22: 242-245, 1980.
5. Kilagawa, T. et al.: New enzyme immunoassays for specific assay and general detection of *Trypanosoma cruzi*, epimastigotes. **Microbiol. Immunol.**, 35: 943-951, 1991.
6. Pan, A. A. et al.: Clinical evaluation of a EIA for the sensitive and specific detection of serum antibody to *Trypanosoma cruzi* (Chagas Disease). **J. Infect. Dis.**, 165: 585-588, 1992.
7. Rocha, A. et al.: Pathology of patients with Chagas disease and acquired immunodeficiency syndrome. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 50: 261-268, 1994.

V EDIÇÃO: Rev: 04/2007

TERMO DE GARANTIA

A **WAMA Diagnóstica** garante a troca deste conjunto diagnóstico, desde que o mesmo esteja dentro do prazo de validade e que seja comprovado por sua assessoria técnica que não houve falhas na execução, manuseio e conservação deste produto. A **WAMA** e seus distribuidores não se responsabilizam por falhas no desempenho do kit sob essas condições.