

MS 10310030077

**Imuno-CON**

# CHAGAS

*Kit para determinação de anticorpos  
anti-Trypanosoma cruzi no soro humano  
por imunofluorescência indireta.*

**CÓD. 1460-I: 60 determinações**

**CÓD. 14100-I: 100 determinações**

**CÓD. 14200-I: 200 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](http://www.wamadiagnostica.com.br)

## **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 acarreta 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 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), as reações de imunofluorescência indireta (IFI) e

os imunoenzimáticos (ELISA).

## **PRINCÍPIO DO MÉTODO**

Os anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* presentes no soro ligam-se ao antígeno fixado na lâmina e são revelados por uma antigamaglobulina marcada com isotiocianato de fluoresceína.

## **APRESENTAÇÃO DO KIT**

### **CÓD. 1460-I (60 determinações)**

1. Lâminas com 6 áreas reativas com suspensão de *Trypanosoma cruzi* (10 lâminas)
2. Antigamaglobulina G humana marcada com isotiocianato de fluoresceína (5ml)
3. Tampão fosfato-salino (PBS) 20x concentrado (3 x 50ml)
4. Glicerina tamponada (4ml)
5. Azul de Evans (2ml)
6. Soro controle positivo (1ml)
7. Soro controle negativo (1ml)
8. Lamínulas (10 unidades)
9. Instruções para uso

### **CÓD. 14100-I (100 determinações)**

1. Lâminas com 10 áreas reativas com suspensão de *Trypanosoma cruzi* (10 lâminas)
2. Antigamaglobulina G humana marcada com isotiocianato de fluoresceína (5ml)
3. Tampão fosfato-salino (PBS) 20x concentrado (3 x 50ml)
4. Glicerina tamponada (4ml)
5. Azul de Evans (2ml)
6. Soro controle positivo (1ml)
7. Soro controle negativo (1ml)
8. Lamínulas (10 unidades)

## 9. Instruções para uso

### **CÓD. 14200-I (200 determinações)**

1. Lâminas com 10 áreas reativas com suspensão de *Trypanosoma cruzi* (20 lâminas)
2. Antigamaglobulina G humana marcada com isotiocianato de fluoresceína (2x5ml)
3. Tampão fosfato-salino (PBS) 20x concentrado (6 x 50ml)
4. Glicerina tamponada (2x4ml)
5. Azul de Evans (2x2ml)
6. Soro controle positivo (2x1ml)
7. Soro controle negativo (2x1ml)
8. Lamínulas (20 unidades)
9. Instruções para uso

### **PREPARAÇÃO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES**

#### **LÂMINAS COM SUSPENSÃO DE *TRYPANOSOMA CRUZI***

**(1):** deixá-las em temperatura ambiente antes de retirá-las do envelope. Estáveis em geladeira (2-8°C), até a data do vencimento.

**ANTIGAMAGLOBULINA HUMANA (IgG) MARCADA (2):** pronta para uso. Estável em geladeira (2-8°C), até a data do vencimento. Proteger da luz. Contém azida sódica 0,1%.

**TAMPÃO FOSFATO-SALINO (PBS) (3):** diluir o PBS concentrado 1/20 (Ex.: 10ml de PBS + 190ml de água destilada ou deionizada). Conservar em geladeira, em recipiente limpo e bem vedado. Desprezar a solução se ocorrer mudança do pH ou turvação. Estável até a data do vencimento. Obs.: Caso ocorra cristalização do PBS antes da sua diluição, colocar em banho-maria 37°C até a completa dissolução dos cristais.

**GLICERINA TAMPONADA (4):** pronta para uso. Estável em

geladeira (2-8°C), até a data do vencimento. Contém azida sódica 0,1%.

**AZUL DE EVANS (5):** pronto para uso. Estável em geladeira (2-8°C), até a data do vencimento. Contém azida sódica 0,1%.

**SORO CONTROLE POSITIVO (6):** pronto para uso. Estável até a data do vencimento. Contém azida sódica 0,1%.

**SORO CONTROLE NEGATIVO (7):** Pronto para uso. Estável até a data do vencimento.

## **AMOSTRAS**

Soro livre de hemólise, lipemia e contaminação. Os soros podem ser conservados em geladeira (2-8°C) até 72 horas. Para um tempo maior, devem ser guardados em freezer a -20°C. Evitar repetidos congelamentos e descongelamentos.

## **MATERIAL NECESSÁRIO, MAS NÃO FORNECIDO**

Microscópio de fluorescência

Pipetas sorológicas

Jarra de Coplin ou similar

Tubos e rack

Água destilada ou deionizada

Frasco para 1 litro

Câmara de incubação

Papel absorvente

## **PROCEDIMENTO**

1. Inativar o soro por 30 minutos a 56°C.
2. Diluir os soros desconhecidos a 1/30 (sugere-se 50µl do soro + 1,45ml de PBS).
3. Deixar a(s) lâmina(s) atingir(em) a temperatura ambiente por 15 minutos, antes de retirá-la(s) do envelope. Removê-la(s), sem tocar no substrato, rotulá-la(s) e colocá-la(s) em câmara úmida.

4. Pingar 1 gota dos controles positivo (6) e negativo (7), **sem diluir**, nas áreas destinadas aos controles da(s) lâmina(s). Evitar transbordar as áreas.
5. Pingar 1 gota dos soros desconhecidos, diluídos 1/30, nas áreas restantes, evitando transbordar, aproximadamente 50ul.
6. Incubar na câmara úmida por 30 minutos em temperatura ambiente.
7. Remover a(s) lâmina(s) da câmara úmida. Segurá-la(s) por uma extremidade e lavá-la(s) com aproximadamente 10ml de tampão fosfato-salino (PBS) (3). Usando uma pipeta, dirigir o PBS pela borda longitudinal da lâmina, tendo o cuidado de não atingir diretamente as áreas reativas, evitando, com isso, prejudicar o substrato. Colocar a(s) lâmina(s) em uma jarra de Coplin ou similar e lavá-la(s) 3 vezes com PBS, 5 minutos cada vez, agitando suavemente o Coplin algumas vezes durante cada lavagem.
8. Remover a(s) lâmina(s) do Coplin, uma de cada vez. Tirar o excesso de PBS sacudindo-a(s) sobre papel absorvente. Secar em torno das áreas reativas e ir **IMEDIATAMENTE** para a etapa 9 para não secar o local da reação.
9. Retornar à câmara úmida. Pingar 1 gota da antigamaglobulina marcada em cada área da(s) lâmina(s), tendo o cuidado de recobri-la(s) totalmente.
10. Incubar na câmara úmida por 30 minutos, em temperatura ambiente, protegendo do excesso de luz.
11. Remover a(s) lâmina(s) da câmara úmida. Segurá-la(s) por uma extremidade e lavá-la(s) com aproximadamente 10ml de tampão fosfato-salino (PBS) (3). Usando uma pipeta, dirigir o PBS pela borda longitudinal da(s) lâmina(s), tendo o cuidado de

não atingir diretamente as áreas reativas, evitando, com isso, prejudicar o substrato. Colocar a(s) lâmina(s) em uma jarra de Coplin ou similar e lavá-la(s) 3 vezes com PBS, 5 minutos cada vez, agitando suavemente o Coplin algumas vezes durante cada lavagem. Pingar 2 a 3 gotas de azul de Evans (5) no Coplin desta última lavagem.

12. Remover a(s) lâmina(s) do Coplin, uma de cada vez. Tirar o excesso de PBS sacudindo-a(s) sobre papel absorvente. Secar em torno das áreas reativas e ir **IMEDIATAMENTE** para a etapa 13 para não secar o local da reação.

13. Pingar 3 a 4 gotas de glicerina tamponada (4) entre as áreas reativas. Cobrir a(s) lâmina(s) com lamínula(s) evitando a formação de bolhas. Secar o excesso de glicerina com papel absorvente. Limpar o dorso da lâmina.

14. Ler em microscópio de fluorescência. É conveniente fazer a leitura no mesmo dia. Entretanto, no caso de não ser possível, conservá-la(s) na geladeira (2-8°C), protegida(s) da luz e lê-la(s) no dia seguinte. A glicerina não deve secar. Se isto ocorrer colocar mais glicerina.

## **RESULTADO DAS LEITURAS**

**Reação Negativa:** AUSÊNCIA de fluorescência amarelo-esverdeada em todo o contorno do *Trypanosoma cruzi*. Os parasitas exibem uma coloração avermelhada.

**Reação Positiva:** PRESENÇA de fluorescência amarelo-esverdeada característica em todo o contorno do *Trypanosoma cruzi*.

**OBSERVAÇÃO:** Examinar sempre os controles positivo e negativo para controle da reação.

## **INTERPRETAÇÃO**

Soros que dão reação negativa são informados como NÃO REAGENTES e significam indivíduos não parasitados. Soros que dão reação positiva são informados como REAGENTES e significam indivíduos parasitados pelo *Trypanosoma cruzi*.

**NOTA:** para uma maior segurança na pesquisa de anticorpos anti-*T. cruzi*, é recomendável a associação de mais de um tipo de teste, buscando uma maior sensibilidade e possibilidade de confronto de resultados. A WAMA Diagnóstica produz o **Kit Imuno-HAI CHAGAS** por hemaglutinação indireta e o **Imuno-ELISA CHAGAS** por enzimaímmunoensaio.

### **DESEMPENHO DO TESTE**

O Imuno-CON Chagas da Wama Diagnóstica apresentou uma sensibilidade de 100% utilizando-se 158 amostras verdadeiramente positivas. Em 261 amostras verdadeiramente negativas, não foram encontrados resultados falso positivo. Apenas em 5 amostras observou-se fluorescência inespecífica, conferindo ao Imuno-CON Chagas da Wama Diagnóstica uma especificidade de 100%.

### **PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS**

1. Reagentes somente para uso diagnóstico *in vitro*.
2. O kit deve ser conservado em geladeira entre 2-8°C.
3. A conservação das lâminas pode ser feita selando as bordas da lamínula com esmalte de unha e guardando-as no escuro entre 2-8°C por, no máximo, 2 meses.
4. Como se emprega azida sódica a 0,1% como conservante, o descarte dos reativos deve ser acompanhado de grandes volumes de água para evitar o acúmulo de resíduos de azida nos encanamentos, pois esta pode reagir com chumbo ou cobre formando sais altamente explosivos. Além disso, a azida é tóxica,



quando ingerida.

5. Todos os materiais humanos usados na preparação dos controles foram testados, com resultados negativos para anticorpos anti-HIV, anti-HCV e 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 os soros controles como materiais potencialmente infecciosos.

6. Seguir as boas práticas laboratoriais (BPLs) na conservação, manuseio e descarte dos materiais.

7. Não substituir componentes deste kit com o de outros fabricantes, nem usar componentes de lotes e códigos diferentes.

8. Não usar fora do prazo de validade.

## 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 catálogo



Número do lote



Proteger do calor

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Camargo, M. E.: Preparation of microscopical slides to simplify immunofluorescence serological titrations. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, 7: 39-40, 1965.
2. Camargo, M. E.: Fluorescent antibody test for serodiagnoses of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, 8(5): 227-234, 1966.
3. Cerisola, J. A. : Immunodiagnosis of Chagas' disease; hemagglutination and immunofluorescence tests. **J. Parasit.**, 56(II): 409, 1970.
4. Dias, J. C. P.: Doenças de Chagas. In: Cimerman, B. e Cimerman, S.: **Parasitologia Humana e Seus Fundamentos Gerais**. Atheneu: 81-111, 1999.
5. Ferreira, A. W. e Ávila, S. L. M.: Doença de Chagas. In: Ferreira, A. W. e Ávila, S. L. M. (eds.). **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes**. Guanabara Koogan: 144-149, 1996.
6. Fife, E. H.; Muschel, L. H.: Fluorescent-antibody technique for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 101: 540, 1959.
7. Levy, A. M. A.: Padronização e avaliação do teste de imunofluorescência com tripomastigotas fixados *in situ* na detecção de anticorpos indicadores da persistência da infecção em chagásicos crônicos. **Tese de Mestrado Universidade de São Paulo**, 1991.
8. Luquetti, O. A. e Castro, A. M.: Diagnóstico sorológico da doença de Chagas. In.: Dias, J. C. P. e Coura, J. R. (eds). **Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas. Um Manual para o Clínico Geral**. Rio de Janeiro: Fiocruz: 99-114, 1997.
9. Ododo, D. et al.: Acute Chagas disease (trypanosomiasis americana) in acquired immunodeficiency syndrome. **Hum. Pathol.** 23: 41-44, 1992.

**V EDIÇÃO: Rev: 08/2007**

### **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.