



Chagatest

ELISA recombinante v.4.0

Ensaio imunoenzimático (ELISA) para a detecção de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*

SIGNIFICADO CLÍNICO

A doença de Chagas, é uma infecção parasitária produzida pelo *Trypanosoma cruzi*. O diagnóstico de laboratório depende do estágio no qual se encontra a doença. Durante a fase aguda, o diagnóstico se efetua diretamente mediante a comprovação dos parasitas no sangue ou por métodos imunológicos que detectem IgM. Durante a fase crônica, podem ser utilizados os métodos imunológicos como: hemaglutinação, imunofluorescência, ensaio imunoenzimático ou Western blot.

FUNDAMENTOS DO MÉTODO

Chagatest ELISA recombinante v.4.0 é um ensaio imunoenzimático "in vitro" para a detecção qualitativa de anticorpos anti-*T. cruzi* em amostras de soro ou plasma humano.

A amostra é diluída na policubeta, cujas cubetas encontram-se sensibilizadas com seis antígenos recombinantes (SAPA, 1, 2, 13, 30 e 36) específicos dos estágios epimastigota e tripomastigota do *T. cruzi*, correspondentes a zonas altamente conservadas entre diferentes cepas. Se a amostra contém anticorpos específicos, estes formarão um complexo com os antígenos e permanecerão ligados à fase sólida. A fração não ligada elimina-se por lavagem e após acrescenta-se o conjugado (anticorpo monoclonal anti-IgG humana conjugado com peroxidase), que reage especificamente com os anticorpos anti-*T. cruzi* imunocapturados. O conjugado não ligado elimina-se por lavagem. A presença de peroxidase ligada ao complexo revela-se mediante a adição do substrato cromogênico, tetrametilbenzidina. As amostras reativas desenvolvem cor azul clara. A reação enzimática é interrompida com ácido sulfúrico que muda a coloração azul clara para o amarelo. A densidade óptica determina-se em forma bicromática a 450/620-650 nm ou 450 nm.

REAGENTES FORNECIDOS

Policubeta sensibilizada: policubeta de tiras recortáveis com 96 cubetas recobertas com antígenos recombinantes de *T. cruzi*.

Diluyente de Amostra: tampão salino com tensoativo. Cor violeta.

Conjugado Concentrado: anticorpo monoclonal anti-IgG humana conjugado com peroxidase (10x). Cor vermelha.

Diluyente de Conjugado: tampão salino com proteíνας.

Revelador: solução de tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio.

Stopper: ácido sulfúrico 2 N.

Tampão de Lavagem Concentrado: tampão salino com tensoativo (25x). Cor verde.

Controle Positivo: soro humano inativado contendo anti-

corpos anti-*T. cruzi*. Cor laranja.

Controle Negativo: soro humano não reativo, inativado. Cor amarela.

REAGENTES NÃO FORNECIDOS

Água destilada ou desionizada.

MATERIAL NECESSÁRIO (não fornecido)

- Micropipetas para medir os volumes indicados
- Ponteiras descartáveis
- Material volumétrico para preparar as diluições indicadas
- Estufa a 37°C
- Papel absorvente
- Luvas descartáveis
- Relógio alarme ou cronômetro
- Hipoclorito de sódio
- Sistema de lavagem de policubetas (manual ou automático)
- Espectrofotômetro para leitura de policubetas

PRECAUÇÕES

- Os reagentes são para uso diagnóstico "in vitro".
- Todas as amostras de pacientes devem ser manipuladas como se fossem capazes de transmitir a infecção.
- Os soros controles foram examinados para antígeno de superfície de Hepatite B (HBsAg) e anticorpos contra o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e da Hepatite C (HCV), encontrando-se não reativos. Porém, recomenda-se mani-pulá-los com as precauções requeridas para amostras potencialmente infecciosas.
- Todos os materiais utilizados no ensaio devem ser tratados a fim de assegurar a inativação de agentes patogênicos. O método recomendado para este procedimento é autoclavar durante 1 hora a 121°C. Os líquidos descartados podem ser desinfetados com hipoclorito de sódio, (concentração final de 5%) durante pelo menos 60 minutos.
- Não intercambiar reagentes de kits e lotes diferentes.
- Não utilizar reagentes de outra origem.
- Evitar o contato das paredes das cubetas com os ponteiras.
- Não utilizar elementos metálicos que possam entrar em contato com os reagentes.
- As policubetas devem ser incubadas em estufa. Não usar banho-maria. Evitar abrir a estufa durante a incubação.
- Evitar que vapores de hipoclorito provenientes dos recipientes de descarte biológicos ou outras formas entrem em contato com os reagentes, pois o hipoclorito afeta a reação.
- Evitar o contato do ácido sulfúrico (Stopper) com a pele, mucosas e os olhos. H315+H320: Provoca irritação cutânea e ocular. H314: Provoca queimaduras na pele e

lesões oculares graves. P262: Não pode entrar em contacto com os olhos, a pele ou a roupa. P305 + P351 + P338: SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar. P302 + P352: SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar com sabonete e água abundantes. P280: Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.

- Evitar o derrame de líquidos e a formação de aerossóis.
- Não pipetar com a boca. Usar luvas descartáveis e protecção nos olhos durante a manipulação das amostras e reagentes do ensaio.
- Todos os reagentes e as amostras devem-se descartar conforme a regulamentação local vigente.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

É importante que todo o material utilizado para a preparação dos reagentes, esteja limpo e livre de detergente e hipoclorito.

Tampão de Lavagem: a baixa temperatura os componentes do reagente concentrado, podem precipitar. Neste caso, esquentar a solução a 37°C até a sua dissolução completa. Para a obtenção do tampão de lavagem pronto para uso, diluir uma parte do Tampão de Lavagem Concentrado (25x) com 24 partes de água destilada ou desionizada. Ex.: 20 ml com 480 ml para uma policubeta.

Conjugado: diluir uma parte de Conjugado Concentrado (10x) com 9 partes de Diluente de Conjugado (ex.: vide a tabela seguinte com volume necessário de Conjugado Concentrado e Diluente de Conjugado):

Nº de cubetas	Conjugado Concentrado	Diluente de Conjugado
8	100 ul	0,9 ml
16	200 ul	1,8 ml
24	300 ul	2,7 ml
32	400 ul	3,6 ml
96	1200 ul	10,8 ml

Policubeta sensibilizada, Diluente de Amostra, Diluente de Conjugado, Revelador, Stopper, Controle Positivo e Controle Negativo: prontos para uso.

ESTABILIDADE E INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Os Reagentes Fornecidos são estáveis sob refrigeração (2-10°C) até a data de vencimento indicada na embalagem. Não congelar.

Tampão de Lavagem Concentrado e Stopper: podem-se conservar a temperatura entre 2 e 25°C.

Tampão de Lavagem: uma vez diluído, é estável 3 meses a temperatura entre 2 e 25°C.

Conjugado: uma vez diluído, é estável 6 horas a temperatura entre 2 e 25°C.

Policubeta sensibilizada: não abrir a embalagem até o momento de uso, e esperar atingir a temperatura ambiente, pois ao contrário se favorecerá a condensação de umidade na superfície das cubetas. As tiras de cubetas não utilizadas devem ser conservadas dentro do envelope com o desse-

cante, perfeitamente fechado e mantida entre 2-10°C. As tiras conservadas nestas condições podem-se utilizar nos 4 meses posteriores desde que não se ultrapasse a data de vencimento do kit.

AMOSTRA

Soro ou plasma

a) Coleta da amostra: obter da maneira habitual.

b) Aditivos: não são necessários para soro. As amostras de plasma poderão ser coletadas com heparina, citrato ou EDTA como anticoagulante.

c) Substâncias interferentes conhecidas: não observam-se interferências por bilirrubina até 42 mg/dl, ácido ascórbico até 50 mg/dl, triglicerídeos até 1600 mg/dl ou hemoglobina até 290 mg/dl. As amostras que contêm partículas, deverão-se clarificar por centrifugação.

d) Estabilidade e instruções de armazenamento: a amostra deve-se conservar sob refrigeração (2-10°C). Caso não se realizar o ensaio dentro das 72 horas, deve-se conservar a -20°C. Não é recomendável realizar vários ciclos de congelamento e descongelamento, posto que pode produzir resultados errôneos. Caso de utilizar amostras congeladas, devem-se homogeneizar e centrifugar antes de seu uso.

A inativação pelo calor pode alterar o resultado.

Não utilizar amostras com contaminação microbiana.

Caso as amostras devam-se transportar, embalar conforme as especificações legais referentes ao transporte de material infeccioso.

PROCEDIMENTO DO ENSAIO

1- Levar os reagentes e as amostras a temperatura ambiente antes de iniciar a prova.

2- Preparar o volume necessário de Tampão de Lavagem diluído.

3- Colocar no suporte de tiras, o número de cubetas requeridas para a quantidade de determinações a realizar, incluindo 2 cubetas para o Controle Positivo (CP) e 3 para o Controle Negativo (CN).

4- Colocar o Diluente de Amostra, após a amostra (A) e os controles, segundo o seguinte esquema:

	A	CP	CN
Diluente de Amostra	100 ul	100 ul	100 ul
Controle Positivo	-	20 ul	-
Controle Negativo	-	-	20 ul
Amostra	20 ul	-	-

Homogeneizar por carga e descarga da micropipeta. Ao adicionar a amostra, o Diluente de Amostra mudará de cor, segundo a tabela seguinte:

Tipo de amostra	Sem amostra	Soro ou plasma	Controle Positivo	Controle Negativo
Cor	Violeta	Azul claro	Alaranjado escuro	Verde

Advertência: as amostras hemolisadas ou com turbidez, podem mudar a cor final sem alterar os resultados. A mudança da cor pode depender do volume de amostra acrescentado e da sua composição. Uma viragem da cor de menor intensidade pode-se dever a uma menor quantidade amostra, a que a mesma não esteja nas condições apropriadas, ou que tenha um nível baixo de proteínas.

5- Para evitar a evaporação, cobrir a policubeta com a fita auto-adesiva fornecida, e incubar 60 ± 2 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Paralelamente, preparar o conjugado diluído (vide a tabela em PREPARAÇÃO DOS REAGENTES).

6- Após da incubação, eliminar completamente o líquido de cada cubeta. Lavar 5 vezes seguindo as instruções de lavagem (vide PROCEDIMENTO DE LAVAGEM).

7- Acrescentar o Conjugado:

Conjugado diluído	100 ul	100 ul	100 ul
--------------------------	--------	--------	--------

Para evitar a evaporação, cobrir a policubeta com fita auto-adesiva.

8- Incubar 30 ± 2 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

9- Lavar 5 vezes seguindo as instruções de lavagem.

10- Colocar o Revelador, transvasando a um recipiente limpo apenas o volume necessário de Revelador. Não voltar o Revelador remanescente ao frasco original. Evitar o contato do reagente com agentes oxidantes.

Revelador	100 ul	100 ul	100 ul
------------------	--------	--------	--------

11- Incubar 30 ± 2 minutos a temperatura ambiente ($18-25^\circ\text{C}$), ao abrigo da luz.

12- Acrescentar o Stopper:

Stopper	100 ul	100 ul	100 ul
----------------	--------	--------	--------

13- Ler a absorbância em espectrofotômetro em forma bicromática a 450/620-650 nm ou 450 nm.

Nota: recomenda-se realizar sempre a leitura em forma bicromática. Caso a leitura for monocromática, realizar um branco de reagentes que deverá ser subtraído das leituras das amostras.

ESTABILIDADE DA MISTURA DE REAÇÃO FINAL

A cor da reação é estável durante 10 minutos, portanto os resultados devem-se observar dentro desse lapso.

PROCEDIMENTO DE LAVAGEM

Eliminar o líquido das cubetas por aspiração ou inversão. As cubetas lavam-se com 300 ul de Tampão de Lavagem diluído. Assegurar-se que a altura alcançada ao encher as cubetas não cause desbordos.

A solução de lavagem deve permanecer em contato com as cubetas entre 30 e 60 segundos.

Garanta-se que após da última lavagem não fique líquido residual. Realize-se um dobre aspirado para eliminar o excesso de tampão. Caso de persistir após este procedimento, inverter a policubeta acima do papel absorvente e batê-la várias vezes a fim evitar resultados errôneos.

Nota: o procedimento de lavagem é crítico para o resultado do ensaio. Se ficar tampão de lavagem nas cubetas ou se as mesmas não estão completamente cheias, obterão-se resultados errôneos. Não deve-se deixar que as cubetas se sequem durante o procedimento. As lavadoras automáticas devem-se enxaguar com água destilada ou desionizada ao final do dia para evitar obstruções pelas sais presentes no tampão de lavagem.

RESUMO DO PROCEDIMENTO

ESTÁGIO	PROCEDIMENTO	PRECAUÇÕES/OBSERVAÇÕES
Diluição	Preparação da solução de lavagem	Dissolução dos cristais de sais
Diluinte de Amostra	Acrescentar 100 ul de Diluinte de Amostra em cada cubeta	
Amostras	Acrescentar 20 ul de A, CP e CN	Observa-se mudança de cor quando acrescenta-se a amostra e os controles
Incubação	Cobrir as cubetas e incubar durante 60 ± 2 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$	Em estufa
Lavagem	Lavar cada cubeta com 300 ul de tampão de lavagem (5 vezes)	Tempo de contato da solução de lavagem entre 30 e 60 segundos. Eliminar completamente o líquido residual das cubetas
Diluição	Conjugado	Durante a incubação com a amostra, diluir o Conjugado Concentrado (10x)
Conjugado	Acrescentar 100 ul de Conjugado diluído	
Incubação	Cobrir as cubetas e incubar durante 30 ± 2 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$	Em estufa

Lavagem	Idem à lavagem anterior	
Revelado	Acrescentar 100 ul de Revelador	Transvasar o volume necessário de Revelador a usar. Não pipetar do frasco original. Descartar o reagente remanescente. Evitar o contato com agentes oxidantes.
Incubação	Durante 30 ± 2 minutos entre 18-25°C	Manter a policubeta ao abrigo da luz
Detenção	Acrescentar 100 ul de Stopper	
Leitura	Ler em espectrofotômetro	Ler dentro dos 10 minutos

CRITÉRIOS DE VALIDAÇÃO DA CORRIDA

O ensaio é considerado válido se cumpridas simultaneamente as seguintes condições:

1- A média das densidades ópticas (D.O.) dos Controles Negativos deve ser menor ou igual a 0,100.

Exemplo:

Leitura 1 = 0,034; Leitura 2 = 0,028; Leitura 3 = 0,029

Média = $(0,034 + 0,028 + 0,029) / 3 = 0,030$

2- Eliminar qualquer Controle Negativo com D.O. maior a 0,100

3- Se eliminar algum Controle Negativo, voltar a calcular a média dos Controles Negativos. Um ensaio é válido se aceitam-se pelo menos dois dos Controles Negativos.

4- A média das D.O. dos Controles Positivos deve ser maior ou igual a 1,300.

Exemplo:

Leitura 1 = 1,697; Leitura 2 = 1,774

Média = $(1,697 + 1,774) / 2 = 1,736$

5- A diferença entre a média das D.O. dos Controles Positivos e Controles Negativos deve ser maior ou igual a 1,200.

Se uma destas condições não se cumprirem, repetir o ensaio. Lembrar que as leituras obtidas dependerão da sensibilidade do analisador utilizado.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

a) Com instrumental óptico

A presença ou ausência de anticorpos anti-*T. cruzi* é determinada relacionando a absorbância da amostra com o valor do Cut-off.

Cut-off = CN + 0,200

CN: média das D.O. do Controle Negativo

Exemplo: $0,030 + 0,200 = 0,230$

Amostras Não Reativas: consideram-se aquelas com absorbâncias menores ao valor Cut-off.

Amostras Reativas: consideram-se aquelas com absorbâncias maiores ou iguais ao valor Cut-off.

b) Interpretação visual

Caso optar por este tipo de interpretação, deve-se considerar Não Reativa toda amostra que não apresentar uma coloração mais forte do que dos Controles Negativos. Pelo contrário, uma amostra netamente amarela considera-se Reativa.

Toda amostra inicialmente reativa, deve-se repetir em duplicata. Se uma ou ambas duplicatas foram reativas, a amostra deverá se considerar reativa.

Uma amostra inicialmente reativa pode ser não reativa em ambas duplicatas. Isto pode-se dever a:

- Contaminação cruzada de uma cubeta não reativa por uma amostra reativa.
- Contaminação da amostra durante a dispensação, imprecisão no dispensado da amostra, Conjugado e/ou Revelador na cubeta.
- Reutilização de ponteiras.
- Contaminação da cubeta com hipoclorito ou outros agentes oxidantes.

Em certos casos uma amostra não reativa pode apresentar uma reação falsamente reativa no ensaio inicial, assim como na suas repetições. Algumas das causas deste fenômeno podem ser:

- Contaminação da amostra durante a sua extração, processamento ou conservação.
- Presença de substâncias interferentes, como auto-anticorpos, fármacos, etc.
- Dispensado e/ou aspirado ineficiente da solução de lavagem (sistema obstruído).

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Vide Substâncias interferentes conhecidas em AMOSTRA. Não utilizar pool de amostras.

Não utilizar outros fluidos corporais como a saliva, líquido cefalorraquidiano ou urina.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE PERFORMANCE

a) Sensibilidade

- Sensibilidade clínica em Painéis de Performance: em um estudo realizado com diferentes painéis comerciais internacionais, obtiveram-se os seguintes resultados: PMT 201 (Anti-*T. cruzi* Performance Panel, BBI, USA): detectaram-se 14 das 14 amostras reativas. PP 0404 (Painel de Performance para Chagas, Q Panel, Brasil): detectaram-se 16 das 16 amostras reativas. PP 0405 (Painel de Performance anti-*T. cruzi*, Q Panel, Brasil): detectaram-se 16 das 16 amostras reativas.

- Sensibilidade clínica em Painéis de amostras reativas anti-*T. cruzi*: em um estudo realizado com 100 amostras de crianças provenientes de região endêmica, com infecção por *T. cruzi* confirmada por diferentes métodos, encontraram-se

reativas a totalidade das amostras com o kit **Chagatest ELISA recombinante v.4.0**.

Em um estudo com 116 amostras reativas provenientes de uma instituição hospitalar, detectaram-se 115 amostras.

b) Especificidade

Em um estudo realizado com 1192 amostras de soros e plasmas de banco de sangue, obteve-se uma especificidade de 99,66%.

Em outro estudo com 477 amostras de soros e plasmas de dois centros de saúde diferentes, encontrou-se uma especificidade de 99,57%.

Com um painel de 474 plasmas provenientes de uma população de alta prevalência, a especificidade obtida foi de 98,30%.

Estudou-se a possível presença de reatividades cruzadas ensaiando amostras provenientes de 491 indivíduos com diferentes condições clínicas que podem ser causa de reações inespecíficas para o teste Chagatest ELISA recombinante v.4.0. Estas condições incluem mulheres grávidas, pacientes hemodialisados, pacientes com doenças auto-imunes ou doenças infecciosas diferentes a Chagas (HIV, HTLV, hepatite C, hepatite B, sífilis, outras). Para esta população, a especificidade foi de 98,37%.

c) Precisão

Avaliou-se a precisão do teste, seguindo o protocolo EP5-A recomendado pela NCCLS. Os ensaios foram realizados com amostras de diferentes níveis de reatividade e com os controles. Realizaram-se 2 ensaios diários, analisando cada amostra por duplicata durante 20 dias.

	Média (D.O.)	Intra-ensaio		Total	
		D.P.	C.V.	D.P.	C.V.
Amostra 1	0,360	0,029	8,07%	0,043	11,90%
Amostra 2	0,550	0,036	6,55%	0,055	10,01%
Amostra 3	0,870	0,063	7,23%	0,093	10,69%
Controle (+)	1,750	0,085	4,83%	0,138	7,89%
Controle (-)	0,028	0,003	10,35%	0,004	14,24%

n = 80

Qualquer resultado Reativo, deve ser conferido por outra técnica. Deve-se lembrar o critério recomendado pelo "Instituto Fatale Chaben" segundo o qual o imunodiagnóstico da infecção deve ser realizado pelo menos por dois dos seguintes métodos: imunofluorescência indireta, hemaglutinação indireta e ELISA, devidamente validados pelo Centro Nacional de Referência.

APRESENTAÇÃO

- 96 determinações (Cód. 1293257).
- 192 determinações (Cód. 1293258).

REFERÊNCIAS

- Frasch, A.; Reyes, M. - Parasitol. Today 6/4, 1990.
- Affranchino, J. et al. - Mol. Biochem. Parasitol. 34:221, 1989.
- Pastini, A.C.; Iglesias, S.R.; Carricarte, V.C.; Guerin, M.E.; Sánchez, D.O.; Frasch, A.C. - Clin. Chem. 40/10:1893, 1994.

- Iglesias, S.R. - Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar", Buenos Aires, 1991.
- Knecher, L.M.; Rojkin, L.F.; Capriotti, G.A.; Lorenzo, L.E. - Int. J. Parasitol. 24/2: 207-211 (1994).
- Umezawa, E.S.; Nascimento, M.S.; Kesper, N. Jr; Coura, J.R.; Borges-Pereira, J.; Junqueira, A.C.V.; Camargo, M. - J. Clin. Microbiol. 34/9: 2143-2147 (1996).
- Umezawa, E.S.; da Silva, J.F. - Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 94/1:285-288 (1999).
- Berrizbeitia, M.; Ndao, M.; Bubis, J.; Gottschalk, M.; Aché, A.; Lacouture, S.; Medina, M.; Ward, B. - J. Clin. Microbiol. 44/2:291-296 (2006).
- Ministerio de Salud y Acción Social, Instituto Nacional de Parasitología "Doctor Mario Fatale Chabén" - Normas para el diagnóstico de la infección chagásica - Resolución ministerial 523/97, 1998.
- Capriotti, G.A.; Felcaro, M.V.; Toplikar, E.M.; Gariglio, R.C. - 52º Annual Meeting AACCC, San Francisco, CA - Clin. Chem. 46/S6:A51, Abs 190A, 2000.
- Pirard, M.; Iihoshi, N.; Boelaert, M.; Lasanta, P.; López, F.; Van der Stuyft, P. - Transfusion 45: 554-561 (2005).
- Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices - Approved Guideline EP5-A 19/2 (1999).

EXPLICAÇÃO DOS SÍMBOLOS

Policubeta **Sensib.**

Policubeta sensibilizada

Diluyente **Muestra**

Diluyente de Amostra

Conjugado **Conc.**

Conjugado Concentrado

Conjugado **Diluy.**

Diluyente de Conjugado

Revelador

Revelador

Buf. Lavado **Conc.**

Tampão de Lavagem Concentrado

Control **+**

Controle Positivo

Control **-**

Controle Negativo

Stopper

Stopper

Os seguintes símbolos são utilizados nos kits de reagentes para diagnóstico da Wiener lab.



Este produto preenche os requisitos da Diretiva Europeia 98/79 CE para dispositivos médicos de diagnóstico "in vitro"

EC **REP** Representante autorizado na Comunidade Europeia

IVD Uso médico-diagnóstico "in vitro"



Conteúdo suficiente para <n> testes



Data de validade



Limite de temperatura (conservar a)



Não congelar



Risco biológico



Volume após a reconstituição

Cont. Conteúdo

LOT Número de lote



Elaborado por:



Nocivo



Corrosivo / Caústico



Irritante



Consultar as instruções de uso

Calibr. Calibrador

CONTROL Controle

CONTROL **+** Controle Positivo

CONTROL **-** Controle Negativo

REF Número de catálogo



Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina