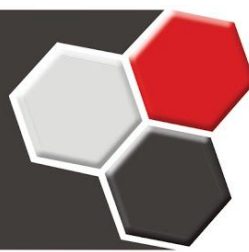


Chagas - HAI

Kit para determinação qualitativa e semi-quantitativa de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*.

REF. 510

MS 80022230163



Analisa

MÉTODO

Hemaglutinação indireta (HAI).

FINALIDADE

Kit para determinação qualitativa e semi-quantitativa de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* no soro por hemaglutinação indireta.

Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

FUNDAMENTO

Eritrócitos estabilizados de aves e sensibilizados com componentes antigênicos do *Trypanosoma cruzi* altamente purificados são aglutinados pelos anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* presentes na amostra analisada.

SIGNIFICADO CLÍNICO

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma infecção endêmica, de evolução essencialmente crônica, causada por um protozoário, o *Trypanosoma cruzi*. É transmitida ao homem pelas fezes de um inseto (triatoma) conhecido como barbeiro. Pelos altos índices de prevalência e morbidade, é considerado um dos maiores problemas de saúde pública em toda América Latina.

Na fase aguda, verifica-se parasitemia, febre, inchaço do fígado e do baço e uma vermelhidão no corpo semelhante a uma alergia e que dura pouco tempo. Nesta fase, nos casos mais graves, pode ocorrer inflamação do coração com alterações do eletrocardiograma e número de batimentos por minuto aumentado.

A pessoa contaminada pode permanecer muitos anos ou mesmo o resto da vida sem sintomas.

Na fase crônica da doença, as manifestações são de doença do músculo do coração, ou seja, batimentos cardíacos descompassados (arritmias), perda da capacidade de "bombeamento" do coração, progressivamente, até causar desmaios, podendo evoluir para arritmias cardíacas fatais.

O coração pode aumentar bastante, tornando inviável seu funcionamento. Outras manifestações desta fase podem ser o aumento do esôfago e do intestino grosso, causando dificuldades de deglutição, engasgos e pneumonias por aspiração e constipação crônica e dor abdominal.

Na fase aguda, o diagnóstico é feito através do exame microscópico de uma gota de sangue do paciente, para a eventual identificação do *Trypanosoma* ou a biópsia de um gânglio linfático.

Na forma crônica, porém, os parasitos tornam-se raros na corrente sanguínea e, então, o diagnóstico deve basear-se em método indireto, verificando se o organismo está produzindo anticorpos contra o *Trypanosoma cruzi*.

Os métodos empregados para a fase crônica são: reação de fixação de complemento, hemaglutinação (HAI), imunofluorescência (IF) e ensaios imunoenzimáticos (ELISA).

REAGENTES

Conservar entre 2-8 °C. Não congelar.

1. Suspensão de Hemácias - Contém suspensão de hemácias de ave sensibilizadas com componentes antigênicos do *Trypanosoma cruzi* em solução tampão salina formalizada. Potencialmente infectante. Pronta para uso. Armazenar em posição vertical para evitar auto-aglutinação irreversível. Deixar em temperatura ambiente antes do uso para estabilização. Homogeneizar bem, sempre com movimentos circulares e por inversão do frasco. Não agitar, pois isto pode acarretar hemólise e/ou autoaglutinação.
2. Diluente - Contém tampão fosfato salino.
3. 2-Mercaptoetanol - Solução concentrada de 2-mercaptoetanol. Pronta para uso. Conservar ao abrigo da luz.
- P. Controle Positivo - Soro de carneiro anti-T.cruzi em tampão fosfato salino e azida sódica 15,4 mmol/L. Pronto para uso.
- N. Controle Negativo - Soro humano em tampão fosfato salino e azida sódica 15,4 mmol/L. Pronto para uso.

MATERIAL AUXILIAR

- Placa de microtitulação contendo 96 poços de fundo em 'V'.
- Manter em sua embalagem original entre 2 a 30 °C.

ESTABILIDADE

Os reativos são estáveis até o vencimento da data de validade impressa no rótulo do produto e na caixa, quando conservados bem vedados na temperatura recomendada. Evitar a contaminação do produto durante o uso para não afetar a sua estabilidade.

MATERIAIS NECESSÁRIOS E NÃO FORNECIDOS

- Tubos de ensaio para diluição e titulação;
- Pipetas sorológicas;
- Estante para uso e rack de ponteiras;
- Recipiente para descarte de material.

PRECAUÇÕES E CUIDADOS ESPECIAIS

- Aplicar os cuidados habituais de segurança na manipulação dos reagentes e amostra biológica.
- Recomendamos o uso das Boas Práticas em Laboratório Clínico para a execução do teste.
- De acordo com as instruções de biossegurança, todas as amostras devem ser manuseadas como materiais potencialmente infectantes.

- Descartar os reagentes e as amostras de acordo com as resoluções normativas locais, estaduais e federais de preservação do meio ambiente.
- Recomendamos o uso de equipamentos de proteção individual (EPI) como avental, óculos de segurança, luvas descartáveis e outros que se fizerem necessários para a realização do teste.
- Não deve ser utilizada a boca para pipetagem de reagentes, amostra ou qualquer outra substância.
- Como se emprega azida sódica como conservante nos controles, o descarte dos reativos deve ser acompanhado de grandes volumes de água para evitar 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.
- O 2-Mercaptoetanol é tóxico e nocivo se inalado. Não ingerir ou aspirar. Evitar contato com a pele, mucosa e olhos.
- Todos os reagentes derivados do sangue humano foram testados para anticorpos anti-HCV, anti-HIV e antígeno HBsAg e apresentaram resultados negativos. No entanto, devem ser tratados com precaução, como potencialmente infectantes. Manusear e descartar segundo as normas de biossegurança.
- Usar exclusivamente a placa do kit, que não deve ser reutilizada.
- Recomenda-se que todos os resultados positivos sejam confirmados por outro método diagnóstico.
- São aceitáveis variações de 1 ou 2 títulos para um mesmo soro nas reações de hemaglutinação.
- Excesso de incubação do soro com 2-mercaptoetanol (mais de 60 minutos) facilita a gelificação parcial do soro.
- Pode ocorrer reação cruzada com leishmaniose visceral e tegumentar.
- Os títulos de anticorpos nas reações de hemaglutinação não costumam apresentar relação com a extensão das lesões ou gravidade clínica.

AMOSTRA

SORO

Usar soros frescos ou conservados a -20 °C de pacientes em jejum.

As amostras devem estar em temperatura ambiente antes do uso e não necessitam de qualquer tratamento prévio.

Não usar soro hemolisado, contaminado ou lipêmico.

Evitar o congelamento e descongelamento repetido do soro.

Os soros envelhecidos tendem a se gelificar ao contato com o 2-mercaptoetanol.

PROCEDIMENTO DO TESTE

Preparo do Diluente de Uso

No momento do uso, misturar 7 µL de 2-Mercaptoetanol (3) com 1000 µL de Diluente (2).

TESTE QUALITATIVO

Objetivo: Fazer triagem e eliminação dos soros não reagentes.

1. Colocar a placa de microtitulação sobre um pano úmido para neutralizar as forças eletrostáticas.
2. Usar uma cavidade da placa por amostra, incluindo sempre os controles positivo e negativo.
3. Diluir em tubo de ensaio (diluição 1/32): 10 µL do soro + 310 µL de Diluente de Uso.
Atenção: Não diluir os soros controles.
4. Pipetar 50 µL de Controle Positivo (P), Controle Negativo (N) e da diluição 1/32 de cada amostra nas respectivas cavidades da placa.
Sugere-se: A1 Controle Positivo, A2 Controle Negativo e A3, A4, A5... soros a serem testados.
5. Adicionar 25 µL da Suspensão de Hemácias (1) homogeneizada em cada cavidade.
6. Agitar a placa por vibração mecânica (agitador de placas) ou batendo com os dedos nas bordas da placa por 3 a 4 minutos.
7. Deixar a placa em repouso por 1 a 2 horas à temperatura ambiente em local livre de vibrações. **IMPORTANTE.**
8. Fazer a leitura.

LEITURA E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Reação Negativa: As hemácias se depositam no fundo da cavidade com um formato semelhante a um botão.

Significa ausência de anticorpos específicos anti-*Trypanosoma cruzi* ou que estes existem abaixo do limite de detecção.

Reação Positiva: Presença de aglutinação. As hemácias se depositam no fundo da cavidade como um tapete, às vezes com bordas irregulares.

Significa presença de anticorpos específicos anti-*Trypanosoma cruzi*.

TESTE SEMI-QUANTITATIVO

Objetivo: Titular os soros que apresentaram reação positiva no teste qualitativo.

1. Preparar diluição do soro com resultado positivo no teste qualitativo a 1/32 conforme item 3 do Teste Qualitativo.
2. Pipetar 50 µL do Diluente de Uso a partir da segunda cavidade da placa até a diluição que se pretende testar.

Ex.: se pretender diluir o soro até 1/512, pipetar 50 µL do Diluente de Uso nas cavidades A2, A3, A4, e A5. Não pipetar na A1.

3. Pipetar 50 µL do soro diluído a 1/32 na primeira e segunda cavidades (A1 e A2). Homogeneizar bem o soro com Diluente de Uso na segunda cavidade (A2) (diluição 1/64) e transferir 50 µL da mistura para a terceira cavidade (diluição 1/128) e assim sucessivamente, desprezando 50 µL no final.

- Pipetar 25 µL da Suspensão de Hemácias (1) homogeneizada em todas as cavidades.
- Agitar a placa por vibração mecânica (agitador de placa) ou batendo com os dedos nas bordas da placa por 3 a 4 minutos.
- Deixar em repouso por 1 a 2 horas à temperatura ambiente em local livre de vibrações. **IMPORTANTE.**
- Fazer a leitura.

LEITURA E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Título da Amostra

Maior diluição que apresentar uma reação positiva.
O ponto final é quando o tapete de hemácias cobre 50 % do fundo da cavidade.

Títulos menores do que 1/32: **Não Reagentes**

Títulos iguais ou maiores que 1/32: **Reagentes**

IMPORTANTE

Para uma maior segurança na pesquisa de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* é recomendável a associação de mais de um tipo de teste, buscando uma maior sensibilidade e possibilidade de confronto de resultados.

CONTROLE DA QUALIDADE

O laboratório clínico deve ter implementado um Programa de Garantia da Qualidade para assegurar que todos os procedimentos laboratoriais sejam realizados de acordo com as Boas Práticas de Laboratório Clínico (BPLC).

Para controle e verificação do desempenho do kit testar amostras controle positivas e negativas.

CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO⁸

Sensibilidade clínica ou diagnóstica

100% de sensibilidade. Foram realizados testes em 83 amostras do controle de qualidade sabidamente positivas para *Trypanosoma cruzi*. Todos os resultados foram satisfatórios, não apresentando falso-negativos.

Especificidade clínica ou diagnóstica

98,7% de especificidade. Foram realizados testes em 235 amostras do controle de qualidade sabidamente negativas para *Trypanosoma cruzi*. Os resultados foram satisfatórios, apresentando somente 4 amostras com resultado falso-positivo.

Repetibilidade - Precisão intra-ensaio

Foram testados três lotes usando 10 amostras do controle de qualidade de resultado conhecido (6 não reagentes e 4 reagentes para Chagas) sob as mesmas condições (mesmo dia e mesmo operador). Através dos testes, os resultados obtidos foram satisfatórios comprovando que o kit identificou corretamente as amostras testadas, obtendo uma repetibilidade de 100%.

Reprodutibilidade - Precisão inter-ensaio

Foram selecionadas 10 amostras do controle de qualidade para realizar o teste de reprodutibilidade, entre elas 4 amostras reagente e 6 não reagente para Chagas. O teste foi realizado em duplicata em três dias diferentes. O kit apresentou uma reprodutibilidade de 100% em todas as amostras

OBSERVAÇÕES

- A observação minuciosa da limpeza e secagem da vidraria, da estabilidade dos reagentes, da pipetagem, da temperatura e do tempo de reação é de extrema importância para se obter resultados precisos e exatos.
- Na limpeza da vidraria pode-se empregar um detergente neutro ou uma solução ácida. A última lavagem deve ser feita com água destilada ou deionizada.
- A água utilizada nos laboratórios clínicos deve ser purificada utilizando-se métodos adequados para as finalidades de uso. Colunas deionizadoras saturadas liberam diversos íons, aminas e agentes oxidantes que deterioram os reativos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bing, D.H.; Weyand, J.G.M.; Stavisky, A.B.: Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. Proc. Soc. Exp. Biol., 1214: 1166-1170, 1967.
- Bone, G.J.; Parent, G.: Stearic acid, an essential growth factor for *Trypanosoma cruzi*. J.Gen. Microbiol., 31: 261-266, 1963.
- Boyden, S.V.: The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. J. Exp. Med., 93.107-120,1951.
- Camargo, M.E.; Hoshino, S.; Siqueira, G.R.V.: Hemagglutination with preserved, sensitized cells, a practical test for routine serologic diagnosis of american trypanosomiasis. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 15(2): 81-85,1973.
- Camargo, M.E. et al.: Hemagglutination test for Chagas' disease with chromiumchloride, Formalin-treted erythrocytes, sensitized with *Trypanosoma cruzi* extracts. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 13 (1), 45-50, 1971.
- Hoshino-Shimizu, S. et al.: A control Chart method for evaluating hemagglutination reagent used in Chagas' disease diagnosis. PAHO Bull., 20(2), 170-178,1986.
- Neal, R.A.; Miles, R.A.: Indirect Hemagglutination test for Chagas' disease, with a simple method for survey work. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 12(5):325-332,1970.
- GOLD ANALISA: Informe Técnico do Produto.

APRESENTAÇÃO

REF.	Nº de Testes	Reagentes	Volume
510	96	Suspensão de Hemácias	2,4 mL
		Diluyente	40 mL
		2-Mercaptoetanol	0,5 mL
		Controle Positivo	1 mL
		Controle Negativo	1 mL
		Placa de Microtitulação	1

TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO

Lei nº 8.078 de 11-9-90 - Código de Defesa do Consumidor

A Gold Analisa garante a substituição, sem ônus para o consumidor, de todos os produtos que comprovadamente apresentarem problemas técnicos, desde que o usuário utilize equipamentos e materiais em boas condições técnicas, siga rigorosamente o procedimento técnico e as recomendações estabelecidas nas Instruções de Uso.

Nº do lote e data de validade: Vide Rótulos do Produto

Gold Analisa Diagnóstica Ltda - CNPJ: 03.142.794/0001-16

AF MS Nº 800222-3 - Reg. MS - Nº 80022230163

Farm. Resp. José Gilmar Pereira Berto - CRF-MG 13421

Av. Nossa Senhora de Fátima, 2363 - Carlos Prates - Fone: (31) 3272-1888

Belo Horizonte MG Brasil CEP: 30710-020











Home page: www.goldanalisa.com.br

E-mail: goldanalisa@goldanalisa.com.br

Setor de Apoio ao Cliente (SAC): 0800 703 1888

Analisa é marca registrada da Gold Analisa Diagnóstica Ltda

SIMBOLOGIA

	Número do catálogo		Limite de temperatura
	Número do lote		Quantidade de testes
	Produto para diagnóstico <i>in vitro</i>		Consultar as instruções de uso
	Data limite de utilização		Fabricado por
	Irritante		Risco biológico

Revisão: 01/18