

Fabricado por: Omega Diagnostics LTD.
 Importado e Distribuído por: BioSys Ltda
 Rua Coronel Gomes Machado, 358, Centro, Niterói, RJ
 Cep: 24020-112
 CNPJ: 02.220.795/0001-79
 MS – nº 10350840117
 SAC: (21) 3907-2534 – sac@biosys.com.br
www.biosys.com.br



PATHOZYME® CHAGAS – EIA CHAGAS Ref OD147

Teste imunoenzimático (EIA) para a detecção de anticorpos IgG anti-*Trypanosoma cruzi* em soro.

Conservar entre 2 - 8°C. Não congelar.

Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

INTRODUÇÃO

Trypanosoma cruzi é um organismo parasitário que infecta, via corrente sanguínea e sistema linfático, as células dos tecidos das musculaturas cardíaca, esquelética, do trato gastrointestinal e nervos. A condição resultante dessas infecções é conhecida como Doença de Chagas. A detecção precoce do *Trypanosoma cruzi* antes da ocorrência de lesões nas fibras musculares e nervos, reduz significativamente o risco de desenvolvimento da Doença de Chagas crônica.

A Doença de Chagas é endêmica das Américas Central e do Sul, resultando em um milhão de novos casos e 45.000 doentes a cada ano. A transmissão do parasita ocorre após a picada do inseto triatomídeo hematofago. As fezes infectadas do inseto entram na corrente sanguínea do indivíduo através da lesão provocada pela picada. O *Trypanosoma cruzi* também pode ser transmitido via transfusão sanguínea e menos comumente via transplacentária. Doadores de sangue positivos geralmente excedem os 20%, fazendo com que a detecção específica de anticorpos anti *T. cruzi* nesses indivíduos passe a ser importante para se limitar os novos casos da doença.

A infecção, como resultado da presença de *T. cruzi* na corrente sanguínea, leva às fases aguda e crônica da doença. A fase aguda é geralmente mais aparente nas crianças e é marcada pela presença de um grande número de parasitas no sangue. Os sintomas podem passar despercebidos ou podem incluir febre, aumento do coração, das glândulas linfáticas, do fígado e do baço. A fase crônica, que se desenvolve após cerca de 10 a 20 anos da fase aguda, é caracterizada por baixo número de parasitas no sangue. Nessa fase, a doença poderá aparecer devido a sinais de lesões no músculo cardíaco e/ou perda da força muscular. Em algumas áreas endêmicas, as lesões severas no músculo cardíaco que levam a falhas do coração, são responsáveis por cerca de 10% das mortes de indivíduos adultos.

FINALIDADE OU USO

PATHOZYME CHAGAS é um teste imunoenzimático (EIA) para a determinação quantitativa e semiquantitativa dos anticorpos anti-IgG contra o *Trypanosoma cruzi* em soro humano.

Somente para uso profissional.

PRINCÍPIO DO TESTE

As cavidades da placa de microtitulação são sensibilizadas com antígeno recombinante específico e purificado do *Trypanosoma cruzi*. O soro a ser testado é diluído a 1/25 e aplicado na cavidade. Anticorpos específicos anti-*T. cruzi* ligam-se aos antígenos presentes na cavidade. O material que não se ligar é removido por lavagens e um anticorpo anti-IgG humana marcado com peroxidase (conjugado) é aplicado. O conjugado liga-se aos anticorpos humanos IgG ligados ao antígeno. O material não ligado é novamente removido por lavagens. Em seguida é adicionado o substrato (TMB). A cor desenvolvida nas cavidades, onde a enzima estiver presente, indica a presença de anticorpos humanos anti-*T. cruzi*. A reação enzimática é bloqueada pela adição da Solução Bloqueadora e a absorbância é medida em 450 nm. A concentração de anticorpos específicos IgG é diretamente proporcional à intensidade de cor da amostra testada.

Este teste foi calibrado em relação a padrões internos. Não existem padrões internacionais para o mesmo.

CONTEÚDO



12 x 8 cavidades x 1

Placa de Microtitulação			
Cavidades sensibilizadas com antígenos específicos, acondicionadas em cartuchos com dessecante.			
Diluyente	Reagente	1	1 X 100 ml
Diluyente de amostra: tampão Tris contendo proteínas estabilizadoras. Pronto para uso (amarelo)			
Controle -	Reagente	2	2 ml
Controle Negativo: solução límpida de soro humano negativo para anticorpos IgG anti- <i>T. cruzi</i> . Pronto para uso (azul)			
Controle +	L	Reagente	3
Controle Positivo Baixo: solução límpida de soro humano contendo baixos níveis de anticorpos IgG anti- <i>T. cruzi</i> . Pronto para uso (verde)			
Controle +	H	Reagente	4
Controle Positivo Alto: solução límpida de soro humano contendo altos níveis de anticorpos IgG anti- <i>T. cruzi</i> . Pronto para uso (vermelho)			
Sol. de Lavagem	20X	Reagente	5
Tampão de Lavagem Concentrado: tampão Tris contendo detergentes (incolor)			
Conjugado	Reagente	6	15 ml
Conjugado anti-IgG humana-HRP: anti-IgG humana conjugada a peroxidase. Pronto para uso (púrpura)			
Substrato	TMB	Reagente	7
Solução Substrato: 3,3', 5,5' Tetrametil Benzidina em tampão citrato. Pronto para uso (incolor)			
Stop	H2SO4	0.2M	Reagente
8			
11ml			
Solução Bloqueadora: ácido sulfúrico diluído em água purificada. Pronto para uso (incolor)			

Instruções de Uso e Folha de Dados EIA 1 + 1

MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO FORNECIDO

- Micropipetas: 100, 200, 1000 e 5000 µl.
- Ponteiros descartáveis
- Tubos para diluição de amostras
- Misturador tipo vortex
- Incubador: temperatura de 37°C (±1°C),
- Papel absorvente
- Leitor de microplacas com filtro de 450 nm
- Papel gráfico

PRECAUÇÕES

PATHOZYME CHAGAS contém materiais de origem humana que foram testados e confirmados com resultado negativo para anticorpos anti-HCV, anti-HIV I, anti-HIV II e HBsAg através de procedimentos aprovados, sendo realizados para cada doador. Como nenhum teste pode oferecer uma completa segurança de que produtos derivados de material humano não transmitam agentes infecciosos, recomenda-se que os reagentes presentes neste kit sejam manipulados e descartados com precaução e atenção.

Todos os reagentes devem ser tratados como materiais de risco biológico durante o uso e descarte. Não ingerir.

PATHOZYME CHAGAS não contém substâncias perigosas como definido no regulamento UK Chemicals (Informações de Perigo e Embalagem para Fornecimento). Entretanto, todos os reagentes devem ser tratados como de risco biológico potencial durante o uso e descarte. O descarte final deve ser realizado de acordo com a legislação local.

PATHOZYME CHAGAS Solução de Bloqueio (Reagente 8) é uma solução de ácido sulfúrico 0,2M e é, portanto, corrosiva. Manipular com cuidado. Em caso de contato, lavar abundantemente com água corrente.

PATHOZYME CHAGAS contém reagentes com 0,05% Proclin 300™* como conservante, que pode ser tóxico se ingerido. Em caso de contato, lavar abundantemente com água corrente.

* Proclin 300™ é uma marca comercial pertencente a ROHM e HAAS Ltda.

CONSERVAÇÃO

Os reagentes devem ser conservados a temperatura de 2°C a 8°C.

A data de vencimento é o último dia do mês indicado nos frascos e na embalagem do kit. Não utilizar os reagentes após a data de vencimento.

Evitar a exposição a temperaturas excessivas. Não expor diretamente a luz solar.

NÃO CONGELAR NENHUM DOS REAGENTES, pois isso causará danos irreversíveis.

PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Obter uma amostra de sangue venoso, permitindo que o coágulo seja formado e retraído. Centrifugar a amostra de sangue coagulada e coletar o soro límpido. O teste requer amostra de soro fresco.

Não usar soro hemolisado, contaminado ou lipêmico para o teste, porque isso afetará desfavoravelmente os resultados.

O soro pode ser armazenado de 2°C a 8°C por até 48 horas antes do uso. Se for requerido um armazenamento mais longo, armazenar a -20°C por até 1 ano. Amostras descongeladas devem ser homogeneizadas antes do uso.

Não use azida sódica como conservante, pois pode inibir o sistema de enzimas peroxidase.

Não congelar e descongelar repetidamente o soro, pois isso pode causar resultados falsos.

DILUIÇÃO DO SORO 1/25: cada teste utiliza 100 µl de uma diluição a 1/25 do soro do paciente. Isso pode ser realizado pela adição de 20 µl de soro a 480 µl de Diluyente de Soro (Reagente 1).

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Todos os reagentes devem estar à temperatura ambiente (20°C a 25°C) e devem ser homogeneizados antes do uso. Evitar a formação de espuma.

Tampão de Lavagem:

Diluir o Tampão de Lavagem Concentrado (Reagente 5) utilizando 1 parte do Tampão de Lavagem concentrado com 19 partes de água destilada. Para cada tira com oito cavidades, preparar 25 ml de tampão diluído, pela adição de 1,25 ml de tampão de lavagem concentrado a 23,75 ml de água destilada. Preparar a solução tampão de lavagem diluída antes de cada ensaio. Tampão de lavagem extra é fornecido para equipamentos de lavagem automatizados.

O procedimento de lavagem é crítico para o resultado do teste. Lavagem insuficiente pode causar diminuição de precisão e falsa leitura baixa na absorbância.

LIMITAÇÕES DE USO

A utilização de outras amostras que não soro não foram validadas para este teste. Não existe protocolo para reutilização deste produto. Levantar em conta os dados clínicos na interpretação dos resultados. O diagnóstico não deve ser feito somente com os achados de um ensaio clínico.

PROCEDIMENTO DO ENSAIO

1. Deixar todos os componentes do kit e as amostras a serem testadas atingirem a temperatura ambiente (20°C a 25°C) antes de iniciar o ensaio.

2. Os controles do kit devem ser testados a cada batelada de amostras. Selecionar o número de cavidades desejadas prendendo-as no suporte. Anotar as posições dos controles e dos soros testes na "Folha de Registro de Dados EIA" fornecida.
3. As tiras que não forem usadas devem ser armazenadas na embalagem metalizada contendo o dessecante, utilizando-se o selador "zip-lock" antes de serem recolocadas a 2°C a 8°C.
4. Pipetar 100 µl das amostras diluídas a 1/25 e dos controles (Regentes 2,3 e 4). NÃO DILUIR OS CONTROLES. Misturar cuidadosamente por 5 segundos. Cobrir a placa e colocar sobre um papel absorvente umedecido no incubador a 37°C.
5. Incubar a 37°C por 60 minutos.
6. No final do período de incubação, descartar o conteúdo das cavidades com um rápido movimento no recipiente de material contaminado. Bater as cavidades sobre um papel absorvente. Assegurar-se que o recipiente de material contaminado contém um desinfetante apropriado.
7. Lavagem Manual: preencher as cavidades com um mínimo de 300 µl de Tampão de Lavagem por cavidade. Despejar o tampão de dentro das cavidades para o interior do recipiente de material contaminado. Bater as cavidades sobre um papel absorvente. Lavar as cavidades 3 vezes.
8. Bater as cavidades sobre um papel absorvente para remover gotículas de água.
9. Lavagem Automática: assegurar-se que 300µl de Tampão de Lavagem é dispensado por cavidade e que o recipiente de material contaminado contém um desinfetante apropriado. Lavar as cavidades 3 vezes. Após lavagem remover o excesso de fluido batendo as cavidades sobre papel absorvente ou papel toalha para retirar todo o resíduo de água.
10. Dispensar 100 µl do Conjugado anti-humano-HRP (Reagente 6) a cada cavidade. Misturar suavemente por 5 segundos antes de retornar a placa para o incubador, assegurando-se que a mesma está posicionada sob o papel absorvente umedecido.
11. Incubar a 37°C por 30 minutos.
12. Lavar as cavidades como descrito acima
13. Dispensar 100 µL da Solução Substrato (Reagente 7) no interior de cada cavidade e misturar suavemente por 5 segundos. Retornar a placa para o incubador, assegurando-se que a mesma esteja posicionada sobre uma superfície seca.
14. Incubar no escuro por 15 minutos a 37°C
15. Bloquear a reação pela adição de 100 µl da Solução de Bloqueio (Reagente 8) a cada cavidade.
16. Misturar suavemente por 30 segundos garantindo que a cor azul mudou completamente para amarelo.
17. Ler em densidade óptica a 450 nm com um leitor de microplacas imediatamente após o bloqueio da reação.

LEITURA DOS RESULTADOS

O leitor de microplacas deve ser colocado no comprimento de onda de 450 nm e zerado contra o ar. Determinar as absorbâncias de todas as amostras e controles. É preferível não usar um filtro de referência, pois isso mudará os valores esperados para os controles.

RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

Para ser utilizado por técnicos com um mínimo de treinamento básico em laboratório. Não utilizar componentes do kit danificados ou contaminados.

Utilizar ponteiras separadas para cada amostra a fim de prevenir a contaminação cruzada

Testar controles e amostras em duplicata, apesar de não requerido, é recomendado.

As amostras e controles devem ser testados ao mesmo tempo para que as condições do teste sejam as mesmas.

Caso se realize pipetagem manual, recomenda-se que não se utilize mais que 32 cavidades em cada ensaio e que a pipetagem de todos os controles e amostras seja realizada dentro de 3 minutos. Uma placa completa de 96 cavidades pode ser utilizada se houver disponibilidade de pipetagem automatizada.

Recolocar as tampas em todos os reagentes imediatamente após o uso.

Evitar pipetagens repetidas dos reagentes estoque, pois isso poderá causar contaminação.

Não misturar reagentes ou cavidades marcadas com anticorpos de diferentes kits. Cuidado para não tocar a superfície da cavidade durante a dispensação.

Evitar que os reagentes escorram pela parede da cavidade. Antes de iniciar o teste deixar os reagentes atingirem a temperatura ambiente (20 °C a 25°C). Homogeneizar todos os reagentes, com cuidado, por inversão ou rotação.

Uma vez iniciado o teste, não deixar que as cavidades sequem.

Não contaminar a Solução Substrato, o que inutilizará o kit.

Checar a precisão e exatidão dos equipamentos laboratoriais utilizados durante o procedimento para assegurar resultados reprodutíveis.

As tiras não utilizadas devem ser armazenadas dentro da embalagem contendo o dessecante, utilizando-se o "zip-lock" antes de serem recolocadas a 2°C a 8°C.

CÁLCULO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Para cada amostra e controle determinar a densidade óptica (DO) obtida em cada cavidade.

Cut-off = $\frac{\text{Média da DO do Controle Positivo Baixo (Reagente 3)}}{1,5}$

Validação do Ensaio: a média das DO's do Controle Negativo (REAGENTE 2) deve ser menor que 0,2; o Controle Positivo Baixo (REAGENTE 3) deve ser maior que 0,35 e o Controle Positivo Alto (REAGENTE 4) deve ser maior que 0,6 para validar os resultados.

Resultado Negativo: um resultado negativo deve ter uma DO menor que o valor de cut-off.

Resultado Positivo Suspeito: um resultado baixo ou suspeito deve ter uma DO menor que a DO do Controle Positivo Baixo, porém maior que o valor do cut-off. Está é considerada a "zona duvidosa"

Resultado Positivo: um resultado positivo deve ter uma DO maior que a "zona duvidosa".

Se os níveis dos controles ou de amostras conhecidas não apresentarem os resultados esperados, os resultados dos testes devem ser considerados inválidos.

DADOS DE DESEMPENHO

Em um estudo clínico, **PATHOZYME CHAGAS** apresentou sensibilidade de 98,3% e especificidade de 98,5% (foram testadas 176 amostras positivas e 453 amostras negativas). Os dados clínicos completos são fornecidos sob pedido. O coeficiente de variação do PATHOZYME CHAGAS é menor ou igual a 10%.

GERENCIAMENTO DE RESÍDUOS

Seguir as disposições da resolução sobre o regulamento técnico para gerenciamento de resíduos de serviços de saúde bem como outras praticas de biossegurança equivalentes, revisão em vigor.

GARANTIA

Estas instruções de uso devem ser lidas atentamente antes da utilização do produto e as instruções nela contidas devem ser rigorosamente cumpridas. A confiabilidade dos resultados do ensaio não poderá ser garantida em caso de desvio às instruções.

Nº de lote, data de fabricação e validade: vide rótulos dos frascos e da embalagem do kit.

REFERÊNCIAS:

1. **PESTINI, Anac** et al. Immunoassay with Recombinant Trypanosoma cruzi antigen potentially useful for screening donated blood and diagnosing Chagas Disease. Clin. Chem., 1994, 40:1893-1897
2. **CAMARGO ME, TAKEDA GF**, Diagnóstico de laboratório. In Brenner Z, Andrade Z, eds. Trypanosoma cruzi e doença de Chagas. Brazil: Guanabara Koogan, 1979: 175-98.
3. **KIRCHHOLF LV, NEWS FA**. Chagas' disease in Latin American immigrants. J. Am. Med. Assoc., 1985 254: 3058-60.
4. **SCHMUNIA GA**. Chagas Disease and blood transfusion. In: Dodd RY, ed. Infection, immunity and blood transfusion. New York : Alan R Liss Inc., 1985: 101-26.
5. **SCHMUNIA GA**. Trypanosoma cruzi, the etiologic agent of Chagas Disease, status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. Transfusion, 1991, 31: 547-57.
6. **BATTENCOURT AL**. Congenital Chagas Disease. Am. J. Dis. Child. 1976, 130: 97-103.
7. Control of Chagas Disease. WHO Tech Rep. Ser. 811. Geneva : WHO , 1991: 27-31.
8. Tropical disease research. TDR seventh programme report (1 January 1983- 31 december 1984). WHO, 1985.

PROCEDIMENTO DO TESTE – REFERÊNCIA RÁPIDA

1. Diluir o soro teste a 1/25, adicionando 20µl de soro a 480µl de Diluente do Soro (Reagente 1)
2. Dispensar 100µl do soro teste diluído e controles, **não diluir os controles**, (Reagentes 2,3 e 4) a cada cavidade. Misturar suavemente por 5 segundos.
3. Incubar a 37°C por 60 minutos.
4. Descartar o conteúdo das cavidades e lavar 3 vezes com Tampão de Lavagem diluído.
5. Adicionar 100µl do Conjugado anti-humano-HRP (Reagente 6) a cada cavidade. Misturar suavemente por 5 segundos.
6. Incubar a 37° C por 30 minutos.
7. Descartar o conteúdo das cavidades e lavar 3 vezes com Tampão de Lavagem diluído.
8. Adicionar 100µL da Solução Substrato (Reagente 7) a cada cavidade. Misturar suavemente por 5 segundos.
9. Incubar no escuro por 15 minutos a 37°C.
10. Adicionar 100µl da Solução de Bloqueio (Reagente 8) a cada cavidade. Misturar suavemente por 30 segundos.
11. Ler as DOs em um leitor de microplacas com filtro de 450nm.

8074 ISSUE 4A Revised December 2008
© Omega Diagnostics Ltd., 2008



OMEGA DIAGNOSTICS LTD.
Omega House, Hillfoots Business Village
Alva FK12 5DQ, Scotland, United Kingdom
odl@omegadiagnostics.co.uk
www.omegadiagnostics.com
AN ISO 9001:2000 AND ISO 13485:2003 CERTIFIED COMPANY