

INSTRUÇÃO DE USO

GOLD ELISA CHAGAS

REF

IVD



96/480

Código REM: 02OR1221K6
Código REM: 02OR1222K5

INTENÇÃO DE USO

O Kit GOLD ELISA CHAGAS é um ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizado para a detecção qualitativa e semi-quantitativa de anticorpos IgG e IgM anti-*Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) em soro ou plasma humano. É indicado como teste de triagem e como auxiliar no diagnóstico de potencial infecção por *T. cruzi*.

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas ou tripanosomíase americana é uma zoonose causada pelo parasito protozoário *Trypanosoma cruzi* e constitui-se em uma das endemias mais importantes da América Latina, afetando mais de 15 milhões de indivíduos. A doença recebeu esse nome após a descoberta do parasito por Carlos Chagas em 1909 (7, 8, 12).

A doença é transmitida principalmente através das fezes contaminadas por *T. cruzi* de um inseto hematófago pertencente à sub-família Triatominae (barbeiro). Durante a sucção de sangue, o inseto defeca no local da picada, e a inoculação do parasito ocorre quando o hospedeiro coça a pele (transdérmica) ou os olhos com as mãos contaminadas (transmissão através das membranas mucosas). Outras formas de transmissão que também podem ocorrer são: transfusões sanguíneas, infecções congênicas através de mães infectadas, aleitamento materno, transplante de órgãos, acidentes laboratoriais pela manipulação de sangue contaminado e ingestão de alimentos contaminados por vetores ou fezes de vetores parasitados (7).

Durante o ciclo de vida, o parasito *T. cruzi* assume diferentes formas de desenvolvimento, nos hospedeiros vertebrados e nos insetos vetores. No momento da picada, as formas tripomastigotas metacíclicas presentes nas fezes do inseto infectam o hospedeiro vertebrado. Uma vez infectados, invadem as suas células, transformando-se em formas amastigotas, que se multiplicam dentro das mesmas. As formas amastigotas se transformam em tripomastigotas sanguíneas, que são liberadas quando há a ruptura da célula. As formas tripomastigotas sanguíneas liberadas podem infectar novas células hospedeiras, ou permanecer na corrente sanguínea, podendo infectar o inseto no momento da picada. No sistema digestório do inseto, a forma tripomastigota sanguínea evolui para duas formas replicativas, epimastigotas e esferoamastigotas, que proliferam, e quando alcançam o reto, se diferenciam na forma infectante tripomastigota metacíclica, completando o ciclo de vida. (1, 3, 6, 7, 8, 9).

Após a infecção, o período de incubação é de 1-2 semanas (20-40 dias a fase aguda transfusional), e a doença é manifestada primeiramente por uma fase aguda curta caracterizada por uma elevada parasitemia (7). A fase aguda da doença é na maioria das vezes assintomática, exceto em crianças muito pequenas, que podem desenvolver miocardite e meningoencefalite, sendo a última fatal em 50% dos casos (2). Em casos sintomáticos, a fase aguda pode apresentar o sinal de Romaña característico (edema unilateral dos olhos, pálpebras e glândulas lacrimais) e o chagoma de inoculação (inchaço característico no local de inoculação), que aparecem após 4 a 10 dias do contato com o vetor (4,9). O primeiro sintoma observado no paciente infectado é a febre, que pode permanecer por muitas semanas, acompanhada por taquipnéia e taquicardia. Outras manifestações clínicas tais como hepato e esplenomegalia, linfadenopatia, náuseas, vômitos, diarreias, anorexia, irritação de meninges e edema sub-cutâneo também estão eventualmente presentes. Também podem ocorrer: dilatação, deficiência cardíaca e várias formas de arritmia. Estudos mostraram que a fase aguda permanece por cerca de dois meses (algumas vezes, 4 meses), desaparecendo mesmo na ausência de tratamento específico (4).

Após a fase aguda, a infecção progride para uma longa fase crônica que pode ser assintomática, e que pode durar décadas (10 a 30 anos) ou até mesmo toda a vida do hospedeiro. Essa fase é chamada de forma inaparente, indeterminada (latente) ou sub-clínica. É nesta fase de equilíbrio entre o hospedeiro e o parasito, que o sistema imunológico do paciente apresenta intensa resposta imune celular e humoral. Existe uma diminuição de parasitos na circulação do hospedeiro. O paciente não apresenta alterações patológicas significativas. O diagnóstico clínico é difícil, pois os pacientes podem ser assintomáticos, mesmo que os testes sorológicos e parasitológicos sejam geralmente positivos. (4).

Após a fase latente, a infecção pode progredir para um estágio crônico sintomático, na qual os parasitos são raramente encontrados, e ocorrem danos progressivos e irreversíveis de alguns órgãos, especialmente coração, esôfago e cólon, que são responsáveis pelas formas cardíaca e digestiva da doença. A forma cardíaca é caracterizada por uma miocardite crônica, que geralmente leva a uma cardiomegalia, insuficiência cardíaca congestiva e arritmias. Na forma digestiva da doença, a dilatação do esôfago ou cólon (megaesôfago e megacólon, respectivamente) pode ser observada em estágios avançados (4, 7, 11). No Brasil, a forma assintomática ou indeterminada é a mais comum (60-70%), seguida pelas formas cardíaca (20%-40%) e digestiva (7-11%). A forma cardio-digestiva é a mais rara. (7)

Após a transmissão do parasito *T. cruzi*, a doença de Chagas progride com a produção cronológica de classes específicas de anticorpos durante o desenvolvimento da infecção. Anticorpos da classe IgM aparecem primeiramente como característica da fase aguda da doença. Os anticorpos da classe IgG, presentes também na fase aguda, acompanham a infecção pelo resto da vida. (16)

O kit GOLD ELISA CHAGAS é específico e sensível e utiliza como antígeno lisados purificados de formas epimastigotas do parasito, enriquecido com antígeno recombinante, capazes de capturar e detectar anticorpos IgG e IgM anti *Trypanosoma cruzi* em soro ou plasma humano.

A tecnologia ELISA utiliza o princípio de que antígenos ou anticorpos que fiquem ligados à fase sólida podem ser detectados por um antígeno ou anticorpo complementar que é marcado com uma enzima capaz de reagir com um substrato cromogênico. Quando o substrato enzimático é aplicado, o antígeno ou anticorpo pode ser detectado pelo desenvolvimento de um produto final colorido. Imunoensaios deste tipo foram desenvolvidos primeiramente no início de 1970. A partir desta data, a tecnologia ELISA tem sido amplamente utilizada para a detecção de antígenos e anticorpos de uma ampla variedade de doenças infecciosas.

Qualquer amostra que se apresentar reagente em um teste inicial (Inicialmente Reagente: IR) com o kit GOLD ELISA CHAGAS deve ser repetida em duplicata. A reatividade em qualquer duplicata testada é altamente preditiva para a presença de anticorpo em indivíduos com elevado risco de infecção. (Repetidamente Reagente: RR). Amostras repetidamente reagentes (RR) devem conter anticorpos anti-*T. cruzi*. No entanto, testes adicionais mais específicos ou suplementares para anticorpos anti-*T. cruzi*, como imunofluorescência (IF) ou imunoblot devem ser realizados para confirmar a especificidade de anticorpos anti-*T. cruzi*. O isolamento do parasito é outro teste laboratorial adicional que pode confirmar a infecção.

PRINCÍPIO DO PROCEDIMENTO

O kit GOLD ELISA CHAGAS é um método imunoenzimático (ELISA) indireto, que utiliza na fase sólida (microplacas de poliestireno) uma combinação de antígeno recombinante e antígenos lisados purificados obtidos da forma epimastigota do parasito *T. cruzi* (cepas de origem brasileira) para a detecção qualitativa e semi-quantitativa de anticorpos IgG e IgM anti *Trypanosoma cruzi* específicos em soro ou plasma humano.

Na primeira etapa, as amostras e os soros controles são diluídos no Diluente de Amostra que possui uma coloração verde. A adição da amostra ou controle resulta em uma mudança de coloração do diluente de verde para azul, a qual pode ser monitorada visualmente ou fotometricamente em 620 ou 630 nm (ver item c do Procedimento do Ensaio). As amostras diluídas e controles são incubados com a fase

sólida. Se anticorpos IgG ou IgM anti *T. cruzi* específicos estiverem presentes nas amostras ou controles, eles se ligarão ao antígeno da fase sólida formando complexos antígeno-anticorpo, e não serão removidos na etapa de lavagens. Se anticorpos anti-*T. cruzi* não estiverem presentes, os complexos não serão formados, e na etapa subsequente de lavagens, as proteínas não ligadas do soro ou plasma serão removidas.

Na segunda etapa de incubação, o conjugado enzimático [anticorpos monoclonais de camundongo anti-IgG e anti-IgM humana marcados com HRP (peroxidase)] irá se ligar aos anticorpos (IgG e/ou IgM) anti-*T. cruzi* específicos já ligados aos antígenos da fase sólida. É, então, realizada uma segunda etapa de lavagens, e os complexos de anticorpos já ligados à fase sólida e ao conjugado não serão removidos durante a etapa de lavagens. Nas amostras que não houver anticorpos específicos, o conjugado não ligado será removido.

Na terceira etapa, ocorre a adição do substrato cromogênico [3, 3', 5, 5'-Tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio]. As amostras contendo anticorpos anti-*T. cruzi* específicos apresentarão uma coloração no ponto final da reação, resultante da reação do conjugado marcado com HRP com o substrato cromogênico. Se o conjugado ligado estiver presente, o TMB será oxidado, resultando em um produto final colorido. Nesta reação, a peroxidase cliva o peróxido de hidrogênio para formar um composto intermediário que irá oxidar o TMB formando um produto azul. Ao final da incubação do substrato/cromogênio, é adicionado um reagente de bloqueio (Ácido Clorídrico 1M) às microcavidades para interromper a reação enzimática. Nesse meio ácido o produto TMB oxidado fica amarelo.

A intensidade da cor é proporcional à quantidade de conjugado ligado e, portanto, é uma função da concentração de anticorpos anti-*T. cruzi* presente na amostra. A intensidade da cor é medida com uma leitora padrão de microplacas ELISA (fotômetro) em um comprimento de onda de 450 nm com filtro de referência de 620/630 nm destinada a medir a absorbância do produto colorido.

REAGENTES

Material Fornecido:

O kit é fornecido nas apresentações de 96 e 480 testes.
Armazenar o kit fechado de 2-8°C.

COMPONENTES	96 TESTES (96T)	480 TESTES (480T)	ARMAZENAMENTO
Microplaca sensibilizada. Microplacas sensibilizadas com antígeno <i>T. cruzi</i> : combinação de antígeno recombinante e de antígenos lisados purificados obtidos da forma epimastigota do <i>T. cruzi</i> . Contém 96 cavidades compreendendo 12 tiras de 8 cavidades quebráveis.	1 Microplaca	5 Microplacas	As microplacas não abertas, devem ser armazenadas de 2-8°C, e são estáveis até a data impressa no rótulo da embalagem. Uma vez aberta, as tiras não usadas devem ser armazenadas de 2 a 8°C na embalagem original, com o dessecante, bem fechada, para protegê-las da exposição à umidade. A placa aberta mantida nas condições acima, é estável por 45 dias.
Diluente de Amostra. Pronto para uso. Tampão fosfato com estabilizantes e indicador colorimétrico de adição de amostra. Conservante: 2-cloroacetamida 0,1%.	1 frasco 25 mL	1 frasco 125 mL	Devem ser armazenados de 2 a 8°C, sendo estáveis até a data impressa no rótulo.
Controle Positivo. Pronto para uso. Soro humano inativado contendo anticorpos anti- <i>T. cruzi</i> e não reagente para HBsAg e anticorpos para HCV, HIV-1, HIV-2, HTLV-I, HTLV-II e HBV. Corante: azul. Conservante: Proclin 300 1%.	1 frasco 0,4 mL	1 frasco 1,2 mL	
Controle Negativo. Pronto para uso. Soro humano não reagente para HBsAg e anticorpos para HCV, HIV-1, HIV-2, HTLV-I, HTLV-II, HCV e HBV. Corante: amarelo. Conservante: Proclin 300 1%.	1 frasco 0,5 mL	1 frasco 1,8 mL	
Conjugado. Pronto para uso. Anticorpos monoclonais de camundongo anti-IgG e anti-IgM humana marcados com peroxidase (HRP), em tampão fosfato-salina com estabilizantes e corante amarelo. Conservante: Proclin 300 1%.	1 frasco 25 mL	1 frasco 125 mL	
Substrato/Cromógeno. Pronto para uso. 3, 3', 5, 5'- Tetrametilbenzidina (TMB) e 0,27% de peróxido de hidrogênio.	1 frasco 25 mL	1 frasco 125 mL	
Solução Bloqueadora. Pronto para uso. Ácido Clorídrico (HCl) 1M. CORROSIVO.	1 frasco 35 mL	1 frasco 75 mL	
Solução de Lavagem Concentrada 20X. Tampão fosfato-salina e detergente. Conservante: 2-cloroacetamida 2%.	1 frasco 100 mL	3 frascos 100 mL	Deve ser armazenado de 2 a 8°C, sendo estável até a data impressa no rótulo. Após diluída, a Solução de Lavagem 1X é estável por 15 dias à temperatura ambiente (15°C-30°C) ou 30 dias de 2 a 8°C.
Selos adesivos descartáveis	5 unidades	20 unidades	
Instruções de Uso	1 unidade	1 unidade	

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Micropipeta multicanal ajustável capaz de dispensar 100 µL e 200 µL (precisão: ± 5%) ou dispensador de reagente equivalente.
- Micropipeta de canal único fixo ou ajustável capaz de dispensar 20 µL (precisão: ± 5%) ou dispositivo de diluição-pipetagem equivalente.
- Ponteiras descartáveis para pipetas de 20 µL a 300 µL ou equivalentes.
- Reservatórios plásticos para micropipeta multicanal (número suficiente para cada reagente utilizado).
- Lavadora de microplacas ELISA (parâmetros de Lavagem: no mínimo 300 µL de Solução de Lavagem 1X por cavidade; tempo de molho: 20 segundos). Consultar o Manual do Usuário do Equipamento para informações técnicas adicionais.
- Leitora de Microplaca ELISA com comprimento de onda duplo, com capacidade de leitura em 450 nm com um filtro de referência de 620 ou 630 nm. Se um equipamento sem um filtro de referência for utilizado, as áreas do fundo das microcavidades que estiverem opacas, arranhadas ou irregulares poderão causar leituras elevadas. A linearidade da leitora de microplacas deve variar de no mínimo 0 a 2,5 unidades de absorbância. Consultar as especificações do fabricante do equipamento.
- Incubadora 37°C ± 2°C.
- Água ultra-pura (Tipo I) ou destilada (Tipo II) são aceitáveis (Ver o item "Precauções").
- Hipoclorito de sódio 5% (desinfetante a base de cloro) ou outro desinfetante substituído aprovado para uso.

Utilizar somente água ultra-pura ou destilada para fazer a diluição da Solução de Lavagem.

PRECAUÇÕES

I – Gerais

1. Somente para uso diagnóstico in vitro.
2. O Kit deve ser armazenado de 2-8°C. Deixar todos os reagentes do kit e as amostras atingirem a temperatura ambiente (15°C - 30°C) antes de usar (aproximadamente 30-60 minutos), e após o uso retornar os reagentes do kit a temperatura de 2-8°C.
3. Evitar o uso de geladeiras com descongelamento automático para o armazenamento dos reagentes e amostras. Repetidos ciclos de congelamento e descongelamento devem ser evitados, pois podem resultar na deterioração das amostras e fornecer resultados errôneos. Após o descongelamento, homogeneizar completamente as amostras antes de ensaiá-las.
4. Não utilizar reagentes com prazo de validade vencido. A data de validade do kit está indicada na rotulagem externa do mesmo.
5. Não misturar reagentes ou componentes de kits com números de lote diferentes ou de outros fabricantes. Quaisquer lotes de Substrato/Cromógeno, Solução de Lavagem Concentrada 20X e Solução Bloqueadora podem ser usados como um "reagente genérico", desde que não sejam utilizados após sua data de validade individual impressa no rótulo.
6. Usar somente material limpo no ensaio. Recomenda-se o enxágue da vidraria com ácido clorídrico 2M seguido de enxágue com água ultra-pura ou destilada.
7. Não fumar, comer, beber ou aplicar cosméticos em áreas onde os kits e amostras são manipulados.
8. Evitar respingos ou a criação de aerossóis.
9. Não pipetar com a boca.
10. Evitar a contaminação cruzada entre reagentes, visto que esta irá invalidar os resultados do teste e diminuir a vida útil do produto. Para isto, recomenda-se o uso de recipientes rotulados para os reagentes adequados, bem como de novas ponteiros para a pipetagem de cada amostra e reagentes.
11. Quando estiver utilizando uma micropipeta de canal único para a adição manual de amostra, utilizar uma nova ponteira para cada amostra a ser ensaiada. Quando estiver utilizando uma micropipeta multicanal, novas ponteiros devem ser usadas para cada reagente a ser adicionado.
12. Todos os instrumentos de pipetagem devem ser usados com cuidado e calibrados regularmente, de acordo com as instruções do fabricante, e procedimentos de cada laboratório.
13. Não permitir que os vapores de hipoclorito de sódio ou outras fontes, isto é, agentes de limpeza, ácidos, solventes, etc. entrem em contato com as tiras de microcavidades durante a análise, porque isso poderá inibir a reação colorimétrica.

II – Biossegurança

14. Durante a realização do ensaio, utilizar luvas descartáveis, vestuário de proteção adequado e equipamentos de proteção individual (EPIs), e ao término do mesmo lavar muito bem as mãos.
15. Alguns componentes do kit contêm derivados de sangue humano. Os soros e plasmas usados na produção dos Controles Positivo e Negativo foram testados e demonstraram ser negativos para anti-HIV-1, anti-HIV-2, anti-HBsAg, anti-HCV, anti-HBc, anti-HTLV-I e anti-HTLV-II. Entretanto, como nenhum método pode oferecer completa segurança de que os agentes infecciosos estejam ausentes, todo reagente e material derivado de sangue humano, inclusive as amostras de pacientes, devem ser manuseados como potencialmente infectantes. Recomenda-se que a manipulação destes reagentes e das amostras humanas seja realizada de acordo com as Boas Práticas de Laboratório e Precauções Universais.
16. Descontaminar e descartar as amostras e todos os materiais potencialmente contaminados como se contivessem agentes infecciosos de acordo com a legislação local, estadual e federal. O método de autoclavagem a 121°C pode ser usado na descontaminação de materiais. Resíduos líquidos podem ser descontaminados com Hipoclorito de sódio a 5% por no mínimo 60 minutos.

III – Reagentes

17. Alguns componentes deste kit podem conter substâncias químicas perigosas. Consultar a folha de dados de segurança do material (MSDS) para informações mais específicas.
18. Utilizar somente água ultra-pura (Tipo I) ou destilada (Tipo II) para fazer a diluição da Solução de Lavagem. Armazenar a água e a Solução de Lavagem 1X em recipiente não metálico.
19. O ProClin 300 é incluído como um conservante no Conjugado, no Controle Positivo e no Controle Negativo. A seguir os Requisitos de Frases de Segurança e Risco:
R: 34-43 – Causa queimaduras. Irritante para os olhos, pele e sistema respiratório. Pode causar sensibilização em contato com a pele e por inalação. Perigo de sérios efeitos irreversíveis e danos aos olhos. Evidências limitadas de efeito carcinogênico.
S: 26-36/37/39-45 – Em caso de contato com os olhos e pele enxaguar imediatamente com água e procurar assistência médica. Retirar imediatamente toda roupa contaminada. Não descartar na pia. Nunca adicionar água a este produto. Tomar medidas de precaução contra descargas estáticas. Utilizar avental, luvas e óculos de proteção. Não respirar os vapores/aerossóis. Em caso de acidente ou indisposição, procurar auxílio médico.
20. Manusear a Solução Substrato/Cromógeno com cuidado, uma vez que ela contém 3, 3', 5, 5' – Tetrametilbenzidina (TMB) e 0,27% de peróxido de hidrogênio; evitar contato com metal, usar somente material plástico ou revestido com teflon. O contato com metal pode reagir com ingredientes ativos da solução e interferir no resultado dos testes.
21. Evitar a inalação, ingestão ou contato do TMB 3, 3', 5, 5' – Tetrametilbenzidina com os olhos, pele ou vestuário, uma vez que o TMB pode causar irritação ou reação alérgica para pele. Se o TMB entrar em contato com a pele, lavar abundantemente com água. Em caso de reação alérgica ou mal estar, procurar um médico. Consultar a respectiva MSDS.
22. O Reagente Substrato/Cromógeno TMB é armazenado em um frasco restritivo à luz. Manter o frasco bem fechado quando não estiver em uso. Trazer o frasco à temperatura ambiente (15°C a 30°C) antes de abri-lo. Abrir o frasco lentamente e evitar a inalação de vapores. O Reagente Substrato/Cromógeno TMB é um líquido límpido de coloração azul clara para transparente. Se este se apresentar turvo ou com coloração azul escura, não utilizar.
23. A solução de bloqueio contém Ácido Clorídrico (HCl) 1M que é um ácido forte e corrosivo. Após o uso, descartá-la de acordo com regulamentos locais aprovados. Lavar as áreas atingidas com respingos imediatamente com água. Se o ácido entrar em contato com a pele ou olhos, lavar abundantemente com água por no mínimo 15 minutos e procurar assistência médica.
R: 34/37: Causa queimaduras. Irritante para o sistema respiratório.
S: 2/26: manter afastado do alcance de crianças. Em caso de contato com os olhos e pele enxaguar imediatamente com água e procurar assistência médica.
Provoca corrosões e irrita os órgãos respiratórios.



IV – Micropilacas

24. As tiras de microcavidades são seladas em embalagens protetoras com dessecante de umidade. Se ao abrir a embalagem o dessecante não estiver presente, não utilizar as tiras no ensaio. Quando retornar as tiras não usadas à embalagem para armazenamento, certificar-se da presença do dessecante antes de fechá-la. Anotar na embalagem a data de abertura da mesma e a data máxima de uso (45 dias a partir da data de abertura), antes de retornar as tiras não utilizadas para o armazenamento. Fechar bem a embalagem com uma fita adesiva ou através de selagem com calor. Anotar na embalagem, a data de cada vez em que a embalagem for aberta para teste, até o vencimento de sua validade.
25. Não tocar na superfície externa inferior das microcavidades. Impressões digitais ou arranhões podem interferir na leitura das microcavidades.

V – Procedimento

26. Assegurar-se de que a amostra foi adicionada às microcavidades. Falha na adição da amostra pode produzir um resultado errôneo. A adição das amostras às microcavidades pode ser monitorada visualmente ou por uma leitura fotométrica (Ver item c do Procedimento do Ensaio).
27. O Diluente de Amostra é de cor verde. O Diluente de Amostra é um Reagente Colorimétrico que apresenta a capacidade de Monitoramento de Adição de Amostra; está designado a mudar de cor quando uma amostra ou controle for adicionado a ele, na cavidade de teste. A não adição da amostra pode ser confirmada quando não ocorrer qualquer alteração da cor do Diluente de Amostras, de verde para azul. Os controles do ensaio são reagentes codificados por cor (com o uso de corantes ao invés de indicadores), e sua adição ao Diluente de Amostras irá provocar uma modificação da alteração da cor final do Diluente de Amostra.
28. Amostras que apresentam hemólise macroscópica podem não apresentar uma alteração de cor visível quando são adicionadas a microcavidades contendo Diluente de Amostras. Amostras hemolisadas poderão necessitar de confirmação visual de que o equipamento de pipetagem dispensou a amostra.
29. Certifique-se de que a temperatura da incubadora seja de 37± 2°C. Incubadoras de CO₂ não devem ser utilizadas.
30. Não utilizar banho-maria para incubação.
31. O cumprimento estrito do procedimento de lavagem especificado é crucial para garantir um melhor desempenho do ensaio. (Ver a etapa 6 do item d do Procedimento do Ensaio).
32. Não deixar que as microcavidades sequem depois do ensaio ter se iniciado.
33. Antes de iniciar a leitura das micropilacas, assegurar que as tiras de microcavidades se encontram niveladas no suporte e que o fundo da superfície exterior das microcavidades encontra-se limpo, seco, e livre de impressões digitais ou arranhões. Verificar também se não há a presença de bolhas na superfície do líquido das cavidades, visto que estes fatores podem interferir na leitura das microcavidades e resultados dos testes. Se necessário, limpar cuidadosamente o fundo da microcavidade com auxílio de um pano absorvente macio e sem fibras.
34. A leitura de microcavidades deverá conter um filtro de referência a um comprimento de onda de 620 nm ou 630 nm. Se for utilizado um equipamento sem um filtro de referência, as áreas no fundo das microcavidades que se encontrarem opacas, riscadas ou irregulares poderão originar leituras elevadas.
35. Os valores de controle negativo ou positivo que não se encontrarem dentro do intervalo esperado poderão indicar um problema técnico ou deterioração do produto.
36. Em ensaios automatizados, seguir estritamente as instruções de uso e manutenção contidas no manual do equipamento, para garantir um adequado desempenho do ensaio, e evitar a contaminação das amostras e reagentes.

COLETA E PREPARO DA AMOSTRA

A coleta de amostra não exige qualquer preparo especial do paciente/doador e deve ser feita assepticamente por punção venosa seguindo técnicas médicas aprovadas.

O ensaio pode ser realizado em soro ou plasma coletado com anticoagulantes à base de citrato, EDTA ou heparina, e deve ser efetuado assim que possível após a coleta. Não utilizar amostras de plasma que tenham sido coletadas com uma razão inadequada de amostra / anticoagulante.

Amostras de soro coletadas em tubos de soro seco ou em tubos gel separadores de soro, devem ser removidas do coágulo e centrifugadas dentro de 24 horas após a coleta.

O sangue deve coagular à temperatura ambiente (15-30°C) e ser centrifugado a 1500 x g por 10 minutos à temperatura ambiente. O soro deve ser separado assim que possível e armazenado de 2 a 8°C por até uma semana ou a -20°C (ou temperatura inferior) por períodos maiores para limitar possível contaminação. Devem ser evitados múltiplos ciclos de congelamento/descongelamento.

Usar preferencialmente amostras recém-coletadas límpidas e sem hemólise. Precipitados presentes nas amostras podem ser removidos por centrifugação.

O descarte das amostras deve ser feito de acordo com os procedimentos locais e normas aplicáveis. Tratar todas as amostras como potencialmente infectantes.

Se as amostras precisarem ser transportadas, elas deverão ser classificadas e embaladas de acordo com regulamentos e diretrizes aplicáveis.

PROCEDIMENTO DO ENSAIO

a) Instruções Gerais:

O Kit deve ser armazenado de 2-8°C. Deixar todos os reagentes do kit e as amostras atingirem a temperatura ambiente (15°C - 30°C) antes de usar (aproximadamente 30-60 minutos), e após o uso retornar os reagentes do kit a temperatura de 2-8°C.

Nota: Se a Solução de Lavagem 1X for armazenada de 2-8°C, removê-la do armazenamento e colocá-la a Temperatura Ambiente (15-30°C) por tempo suficiente para trazer todo o reagente à temperatura ambiente. Misturar bem antes de usar.

1. Aproximadamente 30 a 60 minutos antes de começar o ensaio, trazer todos os componentes a temperatura ambiente (15°C-30°C).
2. Inverter cuidadosamente os reagentes líquidos algumas vezes para homogeneização, evitando a formação de espumas.
3. A temperatura da incubadora deve estar em 37°C ± 2°C.
4. Verificar se todos os equipamentos de dispensação estão ajustados para dispensar os volumes especificados, conforme estabelecido no procedimento do ensaio, seguindo as instruções do fabricante do equipamento. Para pipetagem automatizada, seguir as recomendações do fabricante do equipamento.
5. A não adição de amostra pode ser monitorada visualmente ou fotometricamente conforme item c do procedimento do ensaio.
6. Verificar novamente o volume ajustado das pipetas de dispensação antes de cada uso.

b) Preparação dos reagentes:

b.1) Diluir a Solução de Lavagem conforme descrito abaixo:

Preparação da Solução de Lavagem 1X: Agitar um frasco de Solução de Lavagem 20X e inverter seu conteúdo em uma proveta de 2 litros ou recipiente plástico. Enxaguar 3 vezes o frasco de Solução de Lavagem 20X vazio com água ultra-pura (tipo I), ou destilada (tipo II), e transferir a água do enxágue para a proveta contendo a Solução de Lavagem. O enxágue do recipiente original com água a temperatura ambiente (15°C-30°C) garante a dissolução completa de possíveis cristais formados durante o armazenamento de 2 a 8°C. Completar o volume para 2 litros com água ultra-pura (tipo I), ou destilada (tipo II), à temperatura ambiente. Tampar o recipiente graduado ou calibrado, e inverter cuidadosamente algumas vezes para misturar. A Solução de Lavagem diluída 1X é estável por 15 dias à temperatura ambiente. Para armazenamento por períodos mais longos (até 30 dias), armazenar de 2-8°C, e trazer a Solução de Lavagem 1X à temperatura ambiente (15°C-30°C) antes de usar. Anotar no recipiente a data em que a Solução de Lavagem (1X) foi preparada e a data de validade. Descartar a Solução de Lavagem (1X) se esta apresentar contaminação ou turvação aparente.

NOTA 1: Qualquer número de Lote da Solução de Lavagem Concentrada 20X pode ser usado como um "reagente genérico" para preparar o Reagente Solução de Lavagem 1X, desde que o mesmo não seja usado após sua data de validade individual impressa no rótulo.

NOTA 2: Certificar-se de que a Solução de Lavagem 1X preparada se encontra a temperatura ambiente (15°C-30°C) antes de começar o ensaio.

NOTA 3: A Solução de Lavagem Concentrada 20X mantida de 2-8°C pode conter precipitados químicos cristalizados, uma vez que é uma solução saturada. Agitar bem a Solução Concentrada 20X antes de usar e diluir conforme descrito acima. Todos os componentes químicos serão solubilizados na concentração

de 1X da solução de lavagem. Se um volume menor de Solução de Lavagem 1X precisar ser preparado (inferior ao total do frasco de Solução de Lavagem Concentrada 20X), aquecer a Solução de Lavagem 20X em banho-maria 37°C por até 1 hora e misturar bem para a dissolução de qualquer precipitado químico antes da diluição da Solução de Lavagem 1X.

b.2) Substrato/Cromógeno:

O Substrato/Cromógeno é um reagente "pronto para uso". Porém, qualquer excesso de reagente não utilizado não deve ser retornado ao frasco original e deve ser descartado ao final do ensaio. Antes do final da segunda incubação, transferir uma quantidade suficiente de Substrato/Cromógeno para um recipiente apropriado e proteger o conteúdo da luz. Cada microplaca requer no mínimo 20 mL de Substrato/Cromógeno. Uma quantidade maior pode ser necessária dependendo do dispensador de reagente utilizado. Ver as instruções do fabricante do equipamento para volumes necessários de cada reagente. Seguem abaixo diretrizes para uso geral:

Número de Cavidades	Número de Placas	Volume mínimo de Substrato/Cromógeno (mL)
48	0,50	10
96	1	20
192	2	40
288	3	60
384	4	80
480	5	100

- Não utilizar mais do que um único lote de Substrato/Cromógeno em uma mesma placa. Qualquer número de Lote do Substrato/Cromógeno pode ser utilizado como um "reagente genérico", desde que o mesmo não seja usado após sua data de validade impressa no rótulo.
- Utilizar somente recipientes plásticos limpos, e evitar o contato com qualquer metal.
- O Substrato/Cromógeno é estável em seu frasco original até a data de validade impressa no rótulo, quando armazenado adequadamente. Uma vez removido de seu frasco original para uso, é estável por quatro horas após sua transferência para um recipiente plástico à temperatura ambiente no escuro (proteger o conteúdo da luz cobrindo o recipiente).
- O Substrato/Cromógeno deve apresentar uma coloração azul clara à incolor e límpida. **Se for verificada uma coloração azul intensa ou turvação, descartar, e usar uma nova alíquota.**

c) Monitoramento de Adição de Amostras:

c.1) Para Monitoramento Visual de Adição de Amostras:

- Inspecionar visualmente as microcavidades após a adição das amostras. O Diluente de Amostras apresenta coloração verde. Ao adicionarmos a amostra, a coloração do líquido na cavidade passa a ser azul. A não adição da amostra pode ser confirmada quando não ocorrer qualquer alteração da cor do Diluente de Amostras, de verde para azul. Os controles do ensaio são reagentes coloridos (que utiliza corantes ao invés de indicadores), e a sua adição ao Diluente de Amostras irá provocar uma modificação da alteração da cor final do Diluente de Amostras.
- Se não ocorrer alteração de cor, o resultado da amostra deve ser anulado, e um novo teste deve ser efetuado, de forma adequada. Voltar a testar a amostra em uma única microcavidade e confirmar visualmente a adição da amostra. Não são necessários quaisquer testes adicionais caso não ocorra alteração de cor após novo teste, uma vez que a adição da amostra tiver sido confirmada visualmente.

c.2) Para Monitoramento Fotométrico de Adição de Amostras:

- Limpar o fundo das tiras de microcavidades cuidadosamente com um tecido ou papel absorvente, macio e isento de fibras, antes de realizar a leitura. Encaixar as tiras no suporte de microcavidades.
- Realizar a leitura da microplaca contendo apenas o Diluente de Amostra em um comprimento de onda de 620 ou 630 nm. Após a pipetagem de todas as amostras e controles, ler a placa novamente em um comprimento de onda de 620 ou 630 nm.
- Cada cavidade acrescida de amostra ou controle deve apresentar valores maiores que a D.O. inicial daquela cavidade, com uma diferença superior ou igual a 0,050. Se o valor de D.O. da cavidade com amostra ou controle for menor ou igual ao valor de D.O. sem a amostra, um novo ensaio deve ser realizado para aquela amostra ou controle.

d) Procedimento:

- Determinar o número total de cavidades necessárias para o ensaio. Em cada ensaio deverá ser incluído um branco de Reagente (todos os reagentes, exceto a amostra) (cavidade 1A), 3 controles negativos e 2 controles positivos. As cavidades não usadas devem ser armazenadas de 2 a 8°C bem fechadas na embalagem de alumínio fornecida, com o dessecante.
- Preparar o mapa da placa identificando a localização das amostras e controles nas microcavidades.

Exemplo de um mapa da placa indicando a localização dos controles:

Cavidade 1A		Branco de Reagente (BR)											
Cavidades 1B, 1C, 1D		Controle Negativo (CN)											
Cavidades 1E, 1F		Controle Positivo (CP)											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BR												
B	CN												
C	CN												
D	CN												
E	CP												
F	CP												
G													
H													

- Adicionar os controles e as amostras às cavidades conforme abaixo (ver item c acima sobre monitoramento da adição de amostras):
 - Adicionar **200 µL** de Diluente de Amostra em todas as cavidades, inclusive na cavidade do branco.
 - Adicionar **20 µL** de cada amostra ou controles às cavidades apropriadas (seguindo o mapa da placa).
- Para processamento manual das placas de microcavidades, cobrir o suporte da microplaca com um selo adesivo. Se estiver utilizando um processador de microplacas automatizado para a incubação, seguir as recomendações do fabricante do equipamento com relação à vedação da placa.
- Incubar a **37°C ± 2°C por 30 minutos ± 2 minutos**.
- Com um equipamento de aspiração-lavagem, aspirar e lavar todas as cavidades **5 vezes com tempo de molho de 20 segundos** com a Solução de Lavagem 1X diluída (ver item b.1 acima), conforme descrito abaixo:

ATENÇÃO: é crucial que o procedimento de lavagem especificado seja estritamente seguido para garantir um ótimo desempenho do ensaio. Seguir as etapas especificadas para garantir uma lavagem completa.

- Aspirar as soluções das microcavidades e preenchê-las completamente com a Solução de Lavagem (no mínimo 300 µL de Solução de Lavagem 1X por cavidade). Não permitir que as cavidades transbordem. Usar aproximadamente 20

segundos de tempo de molho entre as lavagens (adição da Solução de Lavagem 1X e aspiração subsequente).

- Completar a sequência de aspiração-lavagem por mais quatro vezes.
- Aspirar as cavidades completamente. Inverter a microplaca e bater firmemente contra um papel toalha limpo para remover o excesso de Solução de Lavagem, se necessário.

Obs.: se a lavadora usada não tiver ajuste para tempo de molho, incluir mais um ciclo de lavagem (lavar 6 vezes ao invés de 5 vezes).

- Adicionar **200 µL** de Conjugado em todas as cavidades. Para processamento manual das placas de microcavidades, cobrir a placa com um novo selo adesivo ainda não usado. Se estiver utilizando um processador de microplacas automatizado para a incubação, seguir as recomendações do fabricante do equipamento com relação à vedação da placa.
- Incubar a **37°C ± 2°C por 30 minutos ± 2 minutos**.
- Após a segunda incubação, repetir a lavagem das cavidades conforme descrito no item 6 acima.
- Adicionar **200 µL** de Substrato/Cromógeno a todas as cavidades (ver item b.2 acima).
- Incubar à **temperatura ambiente (18 °C - 25°C)**, no escuro, por **15 minutos ± 1 minuto**. **Nota: O bloqueio da reação em 15 minutos ± 1 minuto é crítico para os resultados do ensaio.**
- Adicionar **100 µL** de Solução Bloqueadora a todas as cavidades. Para garantir uma mistura adequada, o ácido deve ser adicionado firmemente em um fluxo constante. Se necessário, homogeneizar a placa cuidadosamente ou usar um agitador de microplacas para misturar o conteúdo. Tomar cuidado para evitar respingos do conteúdo da microplaca. Se estiver utilizando um processador de microplacas automatizado para a incubação, seguir as recomendações do fabricante do equipamento com relação à homogeneização.
- Ler as tiras de microcavidades em um comprimento de onda de **450 nm** com um filtro de referência de **620 ou 630 nm**. Zerar a leitora na cavidade do branco (1A), de acordo com as instruções do fabricante do equipamento.

NOTA 1: As placas de tiras de microcavidades devem ser lidas dentro de 60 minutos após a adição da Solução Bloqueadora. As placas devem ser mantidas no escuro até o momento da leitura.

NOTA 2: Antes da leitura, limpar o fundo exterior da placa com um tecido ou papel toalha macio e isento de fibras.

NOTA 3: Quando estiver realizando cálculos manuais ou estiver utilizando programas de software que não os fornecidos pela REM, o usuário deve certificar-se de que o valor do branco (cavidade 1A) foi subtraído de todos os valores das cavidades de controles e amostras antes de aplicar o critério de Controle de Qualidade a seguir (valores corrigidos).

RESULTADOS ESPERADOS / VALORES DE REFERÊNCIA

O surgimento de anticorpos das classes IgM e IgG são precoces (7-15 dias após a infecção) atingindo níveis elevados a partir da quinta semana após a infecção, coincidindo esta elevação com o aumento da parasitemia detectável ao exame a fresco. Alguns meses após a infecção (três ou mais), há um declínio da parasitemia, e os níveis de IgM diminuem progressivamente até desaparecerem. São raros os casos de IgM positiva durante a fase crônica da infecção. Por outro lado, anticorpos IgG aumentam por mais alguns meses e depois decrescem lentamente estabilizando-se em níveis variáveis de hospedeiro para hospedeiro, podendo ser facilmente detectáveis pelos testes sorológicos ao longo da infecção (9).

PROCEDIMENTOS DE CONTROLE DE QUALIDADE / CONTROLE INTERNO DE QUALIDADE

1. Critério de Aceitação do Branco de Reagentes

Uma placa é considerada válida com relação ao branco de reagentes (todos os reagentes, exceto a amostra) se o valor de absorbância da cavidade do branco de reagentes (cavidade 1A) for maior ou igual a -0,020 e menor ou igual a 0,200.

2. Critério de Aceitação do Controle Negativo

- Os valores dos controles negativos individuais depois de subtraído o valor do branco devem ser menores ou iguais a 0,200 e maiores ou iguais a -0,005. Números que estiverem entre 0,000 e -0,005 inclusive são válidos e devem ser arredondados para 0,000 para efeito de cálculo. Se um dos três valores do controle estiver fora desses limites, recalcular a média do controle negativo (CNx) baseando-se nos dois valores de controle aceitáveis. A placa é inválida e o teste deve ser repetido se dois ou mais dos três valores de controle estiverem fora desses limites e variarem em mais de 20% entre si.
- Determinar a média dos valores de controle negativo (CNx).

Exemplo:

Controle Negativo	Absorbância
1	0,087
2	0,080
3	0,073
Absorbância Total	0,240

$$CNx = \text{Absorbância Total} / 3 = 0,080$$

$$\text{Desvio Padrão (DP)} = 0,007$$

$$\text{Coeficiente de Variação (CV)} = DP / CNx \times 100 = 8,75\%$$

3. Critério de Aceitação do Controle Positivo

O Controle Positivo é usado para verificar se os componentes do kit são capazes de detectar uma amostra reagente desde que o procedimento do ensaio tenha sido estritamente seguido.

Uma placa é considerada válida somente se o Controle Positivo atingir os seguintes critérios:

- O valor de Absorbância de cada Controle Positivo individualmente for maior ou igual a 0,500 e estiver dentro do intervalo linear da leitora de microplacas.
- Se qualquer valor de controle estiver fora desses limites, o ensaio é considerado inválido e deverá ser repetido.

NOTA: Resultados acima do limite superior do intervalo linear da leitora de microplacas podem aparecer como "OVER" ("ACIMA") ou "****" ou ">".

Seguir as normas locais quanto à inclusão de amostras controle adicionais ("controles externos"), que não os fornecidos como parte do kit. Mesmo que sejam incluídas no teste amostras adicionais para controles de qualidade interno ou externo, os Controles Positivo/Negativo do kit **devem ser sempre** incluídos.

CÁLCULO DO VALOR DE CUT-OFF

$$\text{Valor de Cut-off} = \text{média das DOs do CN} + 0,180$$

Exemplo:

Controle Negativo	Absorbância
1	0,087
2	0,080
3	0,073
Absorbância Total =	0,240

Média do CN = Absorbância Total / 3 = 0,080
Valor de Cut-off = 0,080 + 0,180 = 0,260

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

- Amostras com valores de absorbância menores que 0,025 devem ser re-ensaiadas em uma microcavidade única. A amostra deve ser considerada não reagente se o valor de absorbância lido na repetição for menor que o valor de cut-off, mesmo que o valor de absorbância lido na repetição permanecer menor que 0,025.
- Amostras com valores de absorbância menores que o valor do cut-off x 0,9 são consideradas não reagentes (10% abaixo do cut-off do ensaio ou $\leq 0,9$ de índice de reatividade). Ensaio adicional não é necessário.
- Amostras dentro da Zona Cinza (ZC), ou seja, com índice de reatividade entre 0,9 e 1,1 vezes o valor do cut-off, são tratadas como inicialmente reagentes (IR) e devem ser re-ensaiadas em duplicata, antes da interpretação final.
- Amostras com valores de absorbância maiores ou iguais ao valor de Cut-off x 1,1 (10% acima do cut-off do ensaio ou $\geq 1,1$ de índice de reatividade) são consideradas inicialmente reagentes (IR) e devem ser re-ensaiadas em duplicata antes da interpretação final.
- Após re-ensaiar uma amostra inicialmente reagente (IR) ou dentro da zona cinza (ZC):
 - a amostra é considerada não reagente (NR) para anticorpos anti- *T. cruzi* se ambas as duplicatas forem não reagentes, isto é, menores ou iguais ao valor do Cut-off x 0,9.
 - a amostra é considerada repetidamente reagente (RR) para anticorpos anti- *T. cruzi* se ambas as duplicatas forem reagentes, isto é maiores ou iguais ao valor de Cut-off x 1,1.
 - a amostra é tratada como inconclusiva (INC) para anticorpos anti- *T. cruzi* se uma ou ambas as duplicatas estiverem dentro da zona cinza (ZC) ou se apresentarem resultados discordantes entre si.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

O uso do kit deve ser realizado somente por profissionais qualificados e adequadamente treinados.

O Procedimento do Teste e a Interpretação dos resultados do kit GOLD ELISA CHAGAS devem ser estritamente seguidos para garantir a exatidão dos resultados obtidos quando se estiver realizando um ensaio para determinar a presença de anticorpos anti-*T. cruzi* em soro ou plasma humano. Como o kit GOLD ELISA CHAGAS foi desenvolvido para a triagem de unidades individuais de sangue ou plasma, a maior parte dos dados referentes a sua interpretação são provenientes de ensaios de amostras individuais. Não há dados para interpretar os testes realizados em outros fluidos corporais, como: soro e plasma de cadáveres, amostras de animais, pool de amostras de sangue ou plasma processado e produtos feitos a partir desses pools; portanto, o ensaio dessas amostras não é recomendado.

O kit GOLD ELISA CHAGAS detecta anticorpos anti-*T. cruzi* em soro ou plasma e por isso é útil na triagem de doadores de sangue, na avaliação de pacientes com sinais e sintomas e estabelecimento de infecção inicial pelo *T. cruzi*.

Os resultados dos testes devem ser avaliados em relação aos sintomas do paciente, história clínica e outros dados de teste de laboratório para estabelecer o diagnóstico. A presença de anticorpos em uma única amostra não é evidência suficiente para distinguir entre infecção ativa e contato anterior com o agente, ou reações cruzadas com outras substâncias interferentes ou doenças. É recomendado que amostras repetidamente reagentes (RR) sejam investigadas por testes complementares específicos.

Resultados falso-negativos podem ocorrer se a quantidade de anticorpos presentes na amostra for muito baixa para o limite de detecção do ensaio, ou se o anticorpo que é detectado não estiver presente durante o estágio da infecção na qual a amostra foi coletada.

A repetição do teste deve ser considerada quando houver suspeita clínica da infecção ou de erro no procedimento. Algumas fontes de erros do procedimento podem ser:

- Armazenamento inadequado das tiras não utilizadas e de reagentes.
- Contaminação cruzada ou microbiana de reagentes ou amostras.
- Erros na adição de amostras ou reagentes.
- Uso de amostras hemolisadas, amostras contendo materiais particulados, ou amostras que tenham sido inativadas por calor, ou que possam ter sido comprometidas por repetidos ciclos de congelamento-descongelamento ou condições de armazenamento não controladas.
- Lavagem inadequada das microplacas.
- Leitura incorreta das microplacas, devido uso de microplacas com a superfície inferior externa suja ou contendo arranhões.
- Desvios de procedimento de temperatura e tempo do ensaio em etapas de incubação.

Os controles positivos do kit não são destinados para quantificar a sensibilidade do ensaio.

Para detectar soroconversão, devem ser coletadas amostras durante as fases aguda e convalescente da doença ou em intervalos de 10 a 20 dias. A primeira amostra deve ser armazenada a -20°C e testada em paralelo com a segunda amostra.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

A – Repetitividade

Em todas as apresentações do kit, foram ensaiadas em uma mesma microplaca, 30 replicatas de uma amostra de soro positivo e 30 replicatas de uma amostra de soro negativo para a doença de Chagas.

Resultados do teste de repetitividade do kit Gold ELISA CHAGAS

Tipo de Amostra	Média do Índice de Reatividade	Desvio Padrão	Coefficiente de variação (%)
Amostra Positiva	1,31	0,19	14,2
Amostra Negativa	0,36	0,06	16,6

B – Reprodutibilidade

Em todas as apresentações do kit, foram ensaiadas, por dia em uma mesma microplaca, 10 replicatas de uma amostra de soro positivo e 10 replicatas de uma amostra de soro negativo para a doença de Chagas. Esse ensaio foi repetido em 5 dias diferentes, com diferentes operadores e pipetas.

Resultados do teste de reprodutibilidade do kit Gold ELISA CHAGAS

Tipo de Amostra	Média do Índice de Reatividade	Desvio Padrão	Coefficiente de variação (%)
Amostra Positiva	1,299	0,20	15,2
Amostra Negativa	0,352	0,06	17,6

C – Especificidade

A especificidade do kit Gold ELISA Chagas foi avaliada numa população de 4001 doadores de sangue voluntários, presumivelmente saudáveis, de cinco locais diferentes e amostras negativas de soroteca e painéis. Desse total de amostras negativas testadas, 17 deram resultados inicialmente positivos ou inconclusivos e 14 permaneceram com resultados positivos ou inconclusivos após repetição em duplicata.

Portanto, a especificidade (Índice de Confiança 95%) relativa obtida foi de 99,7 (99,5 – 99,8). Os resultados estão resumidos na tabela abaixo:

Especificidade frente a amostras negativas

Número de amostras testadas	Nº de amostras inicialmente reagentes ou inconclusivos	Nº de amostras repetidamente reagentes ou inconclusivos	Especificidade
4001	17	14	99,7%

D – Sensibilidade

A sensibilidade do kit Gold ELISA Chagas foi determinada testando múltiplos lotes em um painel comercial, PMT-201, constituído de 14 amostras positivas e uma negativa. Além disso, foram testadas 202 amostras positivas obtidas de sorotecas e laboratórios. Todas as amostras positivas testadas foram reagentes com o kit Gold ELISA Chagas, resultando uma sensibilidade relativa de 100%. Os resultados estão resumidos na tabela abaixo:

Sensibilidade frente a amostras positivas

Número de amostras positivas testadas	Nº de amostras reagentes	Nº de amostras não reagentes	Sensibilidade
216	216	zero	100%

E – Estudos de Diluição (Limite de Detecção)

Em todas as apresentações do kit, foram ensaiadas 10 amostras caracterizadas como positivas para a doença de Chagas pelo método de referência Imunofluorescência Indireta (IFI). Essas amostras apresentaram títulos variados no teste de IFI, incluindo amostras no limite de detecção da IFI (1/20). Todas apresentaram resultados positivos no kit Gold ELISA Chagas.

F – Análise de Interferentes e Reação Cruzada

As amostras que se seguem foram todas consideradas negativas para doença de Chagas.

Estudo de Interferentes e Reação Cruzada no kit Gold ELISA CHAGAS

Tipo de Amostra	Número de amostras testadas	Resultado Positivo
Lipêmica	9	0
Ictérica	9	0
Hemolisada	32	1
Fator Reumatóide	8	2
Fator anti-nucleólo (FAN) Reagente	16	0
HCV	17	0
HTLV	10	0
HIV	10	0
HBV	21	0
CMV	2	0
Rubéola	1	0
Sífilis	10	0
EBV	8	0
Leishmaniose	16	7

Observou-se que amostras hemolisadas ou positivas para fator reumatóide podem interferir nos resultados do teste Gold ELISA Chagas. Soro de pacientes com anticorpos para *Leishmania spp* podem exibir reação cruzada positiva no kit Gold ELISA Chagas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CONTRERAS, V. T.; NAVARRO, M. C.; DE LIMA, A. R.; ARTEAGA, R.; DURAN, F.; ASKUE, J.; FRANCO, Y. Production of amastigotes from metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro, v. 97, n. 8, p. 1213-1220, dec., 2002.
- CORRAL, R. S.; ALTCHER, J.; ALEXANDRE, S. R.; GRINSTEIN, S.; FREILIJ, H.; KATZIN, A. M. Detection and Characterization of Antigens in urine of patients with acute, congenital and chronic Chagas' Disease. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 34, n. 8, p.1957-1962, aug., 1996.
- DI NOIA, J. M.; BUSCAGLIA, C. A.; DE MARCHI, C. R.; ALMEIDA, I. C.; FRASCH, A. C. C. A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' Disease is due to a single parasite lineage. *J. Exp. Med.*, v. 195, n. 4, p. 401-413, feb., 2002.
- FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. *Doença de Chagas*. In: FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-imunes. 2ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2001, p. 241-249.
- FERREIRA, A. W.; BELEM, Z. R.; LEMOS, E. A.; REED, S. G.; CAMPOS-NETO, A. Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Serological Diagnosis of Chagas' Disease employing a *Trypanosoma Cruzii* Recombinant Antigen that consists of four different peptides. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, n. 12, p. 4390-4395, dec., 2001.
- HAYNES, P. A.; RUSSELL, D. G.; CROSS, G. A. M. Subcellular localization of *Trypanosoma cruzi* glycoprotein Gp72. *Journal of Cell Science*, v. 109, p. 2979-2988, 1996.
- MACEDO, A. M.; OLIVEIRA, R. P.; PENA, S. D. J. Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 2002. Disponível em: <http://www.expertreviews.org/02004118h.htm>. Acesso em: 03/04/2006.
- MANING-CELA, R.; CORTÉS, A.; GONZÁLES-REY, E.; VOORHIS, W. C. V.; SWINDLE, J.; GONZÁLES, A. LYTI protein is required for efficient in vitro infection by *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*, v. 69, n. 6, p. 3916-3923, jun., 2001.
- LANA, M.; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. In: NEVES, D. P.; DE MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. Parasitologia Humana. 11ª Edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2005, p. 85-108.

10. PEREIRA, V. R. A.; NAKAZAWA, M.; FURTADO, V. C.; ABATH, F. G. C.; GOMES, Y. M. Imunodiagnóstico da Doença de Chagas crônica utilizando os antígenos Tc 46 e Tc 58. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop. Uberaba*, v. 33, n. 4, p. 367-370, ago., 2000.
11. PERONE, D.; SANTOS, M. A. M.; PEIXOTO, M. S.; CICALLELLI, R. M. B. *Trypanosoma cruzi*: identification and characterization of a novel ribosomal protein L27 (TrL27) that cross-reacts with an affinity-purified anti-Sm antibody. *Parasitology*, v. 126, p. 577-583, 2003.
12. RODRIGUEZ, J. B. Specific molecular targets to control tropical diseases. *Current Pharmaceutical Design*, v. 7, n. 12, p. 1105-1116, 2001.
13. SOLANA, M. E.; KATZIN, A. M.; UMEZAWA, E. S.; SOSA MIATELLO, C. High specificity of *Trypanosoma cruzi* epimastigote ribonucleoprotein as Antigen in serodiagnosis of Chagas' Disease. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, n. 6, p. 1456-1460, jun., 1995.
14. UMEZAWA, E. S.; BASTOS, S. F.; CAMARGO, M. E.; YAMAUCHI, L. M.; SANTOS, M. R.; GONZALES, A.; ZINGALES, B.; LEVIN, M. J.; SOUSA, O.; RANGEL-ALDAO, R.; DA SILVEIRA, J. F. Evaluation of Recombinant Antigens for Serodiagnosis of Chaga's Disease in South and Central America. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, n. 5, p. 1554-1560, may, 1999.
15. UMEZAWA, E. S.; BASTOS, S. F.; COURA, J. R.; LEVIN, M. J.; GONZALES, A.; RANGEL-ALDAO, R.; ZINGALES, B.; LUQUETTI, A. O.; DA SILVEIRA, J. F. An improved serodiagnostic test for Chagas' Disease employing a mixture of *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. *Transfusion*, v. 43, p. 91-97, jan., 2003.
16. UMEZAWA, E. S.; DA SILVEIRA, J. F. Serological diagnosis of chagas disease with purified and defined *Trypanosoma Cruzi* Antigens. *Mem Inst Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro*, v. 94, suppl. I, p. 285-288, 1999.
17. UMEZAWA, E.S.; LUQUETTI, A.O.; LEVITUS, G.; PONCE, C.; PONCE, E.; HENRIQUEZ, D.; REVOLLO, S.; ESPINOZA, B.; SOUSA, O.; KHAN, B., DA SILVEIRA, J.F. Serodiagnosis of chronic and acute Chagas' Disease with *Trypanosoma cruzi* recombinant proteins: results of a collaborative study in six latin American countries. *Journal of Clinical Microbiology*, p.449-452, Jan., 2004.
18. UMEZAWA, E.S.; NASCIMENTO, M.S.; STOLF, A.M.S. Enzyme-linked immunosorbent assay with *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens (TESA-ELISA) for serodiagnosis of acute and chronic Chagas' Disease. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. Parasitology*, 39: 169-176, 2001.

IMPORTANTE: Para assegurar o bom desempenho do ensaio é recomendado que todas as orientações e procedimentos descritos neste procedimento sejam estritamente seguidos.

SIMBOLOGIA



Para uso diagnóstico in vitro.



Potencialmente Infectante.



Corrosivo e Irritante para os órgãos respiratórios.



96/480

Suficiente para 96/480 testes.



Nº de Lote.



Data de Validade.



Armazenar de 2-8°C



Código do Produto



Atenção: Consultar as Instruções de Uso

Distribuído por: REM Indústria e Comércio Ltda.
Rua Columbus, 282 – Vila Leopoldina
CEP: 05304-010 – São Paulo – S.P.
Fone: (11) 3377 - 9922 Fax: (11) 3377-9900
CNPJ: 47.334.701/0001-20

Fabricado por: REM Indústria e Comércio Ltda.
Rua Columbus, 282, 1º andar – Vila Leopoldina
CEP: 05304-010 – São Paulo – S.P.
Fone: (11) 3377 - 9922 Fax: (11) 3377-9900
CNPJ: 47.334.701/0006-35

Serviço de Atendimento ao Cliente:
REM Indústria e Comércio Ltda.
Rua Columbus, 282 – Vila Leopoldina
CEP: 05304-010 – São Paulo – S.P.
Fone: (11) 3377 - 9922 Fax: (11) 3377-9900
CNPJ: 47.334.701/0001-20

Data da Edição da Bula: 15 dez 06

Revisão: 03/06