

bioelisa CHAGAS3000-1236
3000-123796 tests
480 tests**Teste de ELISA para a detecção de anticorpos contra *Trypanosoma cruzi* no soro ou plasma humano.****Sumário**

A doença de Chagas é uma infecção parasitária crônica causada por um protozoário flagelado, o *Trypanosoma cruzi*. O parasita é transmitido a humanos ou a outros mamíferos por um inseto triatomíneo, da família Reduviidae. A transmissão do *T. cruzi* também pode ser congênita ou por transfusão de sangue contaminado ou ainda por transplante de órgãos. O ciclo de vida do parasita é longo e complexo, com várias etapas de desenvolvimento no inseto vetor e no hospedeiro vertebrado. A doença compreende três etapas: uma fase aguda curta e uma fase crônica de longa duração, separadas por uma longa fase assintomática, chamada fase indeterminada. Na primeira e na terceira etapas diversos órgãos podem ser afetados e a doença pode ser fatal. Se estima que até um 30% das pessoas com a forma indeterminada da infecção sofrerão dano cardíaco, digestivo ou neurológico no transcurso de um período entre 10 e 20 anos após a infecção. Os anticorpos aparecem pouco depois da infecção e alcançam níveis elevados, podendo persistir, junto com a infecção, durante muitos anos. O kit **bioelisa CHAGAS** permite uma detecção específica e de alta sensibilidade dos anticorpos anti-*T. cruzi* nas fases aguda e crônica da enfermidade mediante a técnica de ELISA, graças ao uso de antígenos recombinantes. Se trata de um método econômico que pode ser totalmente automatizado para a triagem de um grande número de amostras de soro em bancos de sangue e laboratórios clínicos.

Princípio

bioelisa CHAGAS é um método imunoenzimático no qual os pocinhos de uma placa de microtitulação são recobertos com antígenos recombinantes que representam 4 epítopos imunodominantes de *T. cruzi*, preparados sob licença de *Corixa Corporation* (patentado em USA). Nestes pocinhos são adicionadas as amostras de soro ou plasma a testar. Se a amostra apresentar anticorpos específicos para *T. cruzi*, estes formarão um complexo estável com os antígenos que recobrem o pocinho. Após a lavagem para extrair todo o material não unido, adiciona-se IgG de coelho anti-IgG e anti-IgM humanas marcada com peroxidase. Se o complexo antígeno-anticorpo estiver presente, o conjugado se unirá ao complexo. Após uma segunda lavagem, procede-se à adição do substrato enzimático e do cromógeno, o que dará como resultado a aparição de cor azul se a amostra for positiva. A cor azul passará a amarelo depois do bloqueio da reação com ácido sulfúrico. A intensidade da cor é proporcional à concentração de anticorpos anti-*T. cruzi* na amostra. Os pocinhos com amostras negativas não desenvolverão nenhuma cor.

Componentes

1. **MCPL** MICROPLACA:
12 x 8 pocinhos recobertos com antígenos recombinantes de *T. cruzi*.
2. **CONJ 51x** CONJUGADO CONCENTRADO:
Anticorpos de coelho anti-IgG e anti-IgM humana conjugados com peroxidase. Contém corante vermelho, mertiolato sódico a 0,02% e proteínas estabilizantes. Diluir 1/51 com o diluente do conjugado antes do uso.
3. **DIL CONJ** DILUENTE DO CONJUGADO:
Tampão Tris que contém corante amarelo, aditivos e mertiolato sódico a 0,02%. Usado para diluir o conjugado concentrado.
4. **DIL SAMP** DILUENTE DE AMOSTRAS:
Tampão Tris com proteínas estabilizantes, azida sódica < 0,1%, Triton X-100 < 1,0% como conservante e etilenoglicol 8%. Pronto para usar.
5. **WASH SOLN 10x** SOLUÇÃO DE LAVAGEM CONCENTRADA:
Tampão fosfato concentrado (10x) que contém Tween 20 a 1% e mertiolato sódico a 0,01%. Diluir 1/10 com água destilada ou deionizada antes de usar-se.
6. **SUBS BUF** TAMPÃO SUBSTRATO:
Tampão citrato-acetato que contém peróxido de hidrogênio.
7. **SOLN TMB** CROMÓGENO:
3,3', 5,5'-Tetrametilbenzina (TMB) dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO).
8. **CONTROL +** CONTROLE POSITIVO:
Soro humano inativado e diluído que contém anticorpos contra *T. cruzi*. Contém corante verde e azida sódica < 0,1% como conservante. Pronto para usar.

9. **CONTROL-** CONTROLE NEGATIVO:
Soro humano diluído negativo para anticorpos contra *T. cruzi*. Contém corante amarelo e azida sódica < 0,1% como conservante. Pronto para usar.
10. **H₂SO₄ 1N** SOLUÇÃO DE BLOQUEIO (somente no kit de 1 placa):
Ácido sulfúrico 1N. Pronto para usar.
11. **SEALS** FOLHAS ADESIVAS:
Para cobrir a placa durante as incubações.
12. **BAG** BOLSA DE PLÁSTICO:
Para guardar as tiras não utilizadas.

Precauções

bioelisa CHAGAS é para o diagnóstico IN VITRO.
Para uso exclusivamente por profissionais.

O **Diluyente de Amostras** contém < 0,1% azida sódica e < 1,0% Triton X-100. A seguir indicam-se os avisos referentes ao risco (R) e à segurança (S):

R22	Nocivo por ingestão.
S46	Em caso de ingestão, consultar imediatamente o médico e mostrar-lhe a embalagem ou o rótulo.

ATENÇÃO: MATERIAL DE RISCO BIOLÓGICO.

O controle positivo foi inativado pelo calor. Todos os materiais de origem humana utilizados na preparação deste produto foram testados e apresentaram resultado negativo em relação à presença de anticorpos contra os vírus HIV-1/HIV-2 e HCV, assim como para o antígeno de superfície da hepatite B, utilizando um método comercial autorizado. No entanto, dado que nenhum método pode oferecer a total segurança da ausência de agentes infecciosos, este produto deve ser manipulado com precaução:

- Não permitir que os reagentes entrem em contato com a pele e os olhos. Se isto ocorrer, lavá-los com abundante quantidade de água.
- Usar luvas.
- Não pipetar nenhum reativo com a boca.
- Não fumar.
- Descartar todos os materiais usados em recipientes adequados para material bio-contaminante. Os restos de amostras, controles, tampões e reativos aspirados, devem ser recolhidos em um recipiente destinado a este fim, que deverá ser autoclavado a 121°C, ou tratar-se com hipoclorito de sódio a uma concentração de 10%, durante 30 minutos. (Os restos que contém ácido devem ser neutralizados antes de adicionar hipoclorito de sódio).
- Alguns reativos deste kit contêm azida sódica. A azida sódica pode reagir com os encanamentos e ralos de chumbo ou cobre, originando azidas metálicas altamente explosivas. Ao descartar os restos de reativos, fazê-lo em abundante volume de água.

Cuidados de manipulação:

- Ajustar o lavador ao tipo de placa utilizada (fundo plano), para conseguir uma boa lavagem.
- Não utilizar reativos procedentes de lotes diferentes.
- Não utilizar os reativos após sua data de validade.
- Não use o reagente se se observar qualquer alteração na aparência dos componentes incluídos no kit.
- Utilizar pontas descartáveis para pipetar as amostras e reativos.
- Tomar as devidas precauções para evitar contaminação microbiana e contaminação cruzada entre reativos.
- Restos de sabões e detergentes, ou agentes oxidantes nos recipientes utilizados para a preparação da solução de substrato-TMB, podem interferir na reação. Por essa razão, caso se utilize recipientes de vidro é recomendável que sejam previamente lavados com ácido sulfúrico ou clorídrico 1N, enxaguados abundantemente com água destilada ou deionizada e secos. Usar de preferência material plástico descartável.
- É muito importante preparar a solução de substrato-TMB 5 a 10 minutos antes de ser utilizada. Mantê-la em um recipiente bem vedado e ao abrigo da luz direta.

Conservação e estabilidade

Os componentes permanecem estáveis até a data de validade indicada nos rótulos se forem conservados entre 2 e 8°C. A bolsa que contém a microplaca deve estar a temperatura ambiente antes de abrir, para evitar a condensação nos pocinhos. Uma vez aberta a bolsa, as tiras são estáveis por 3 meses guardadas a 2-8°C na bolsa de plástico bem fechada, com a bolsinha de silicagel. A solução de lavagem, uma vez diluída, é estável durante 2 semanas, se conservada entre 2 e 8°C. Uma vez diluído, o conjugado deve ser utilizado no mesmo dia. Guardar o cromógeno ao abrigo da luz. A solução substrato-TMB uma vez preparada não é estável, por isso, devem-se seguir estritamente as indicações para sua utilização.

Apresentações disponíveis

- Kit de 1 placa (96 testes), **REF** 3000-1236.
Contém: 1 placa; 1 x 0,35 ml conjugado concentrado; 1 x 15 ml diluente do conjugado; 1 x 30 ml diluente de amostras; 2 x 50 ml solução de lavagem concentrada; 1 x 14 ml tampão substrato; 1 x 1,5 ml cromógeno; 1 x 2 ml controle positivo, 1 x 3 ml controle negativo, 1 x 12 ml solução de bloqueio, 1 bolsa de plástico e folhas adesivas.
- Kit de 5 placas (5 x 96 testes), **REF** 3000-1237.
Contém: 5 placas; 1 x 1,3 ml conjugado concentrado; 1 x 70 ml diluente do conjugado; 1 x 120 ml diluente de amostras; 3 x 100 ml solução de lavagem concentrada; 5 x 14 ml tampão substrato; 1 x 1,5 ml cromógeno; 1 x 5 ml controle positivo; 1 x 7 ml controle negativo, 1 bolsa de plástico e folhas adesivas.

Material necessário não incluído

- Água destilada ou deionizada.
- Pipeta multicanal e micropipetas (10 µl, 100 µl, 200 µl) e ponteiros descartáveis.
- Incubador a 37°C ± 1°C.
- Cronômetro.
- Leitor de microplacas com filtro de 450 nm. Recomendável filtro de referência de 620 ou 630 nm.
- Sistema de lavagem manual ou automático.
- Solução de bloqueio (kit de 5 placas): ácido sulfúrico 1N. Também pode-se empregar ácido sulfúrico 2N ou 4N.

Coleta da amostra

Usar soro fresco ou plasma (EDTA). Outros anticoagulantes devem ser avaliados antes de serem utilizados. As amostras podem ser conservadas por 3 dias entre 2-8°C. Para guardar por um período de tempo mais longo as amostras devem ser congeladas (-20°C). Evitar congelar e descongelar as amostras repetidamente. Partículas em suspensão devem ser eliminadas por centrifugação. As amostras não devem ser inativadas pelo calor, pois podem produzir-se resultados incorretos.

Processamento automático

Esta prova pode ser utilizada de modo automático ou semi-automático com diferentes instrumentos. É muito importante validar qualquer sistema automático para demonstrar que os resultados obtidos para as amostras são equivalentes aos obtidos empregando-se o ensaio manual. É recomendado que o usuário valide periodicamente o instrumento. Se encontrar qualquer dificuldade na programação e ajuste dos processadores automáticos de Biokit, por favor, contate seu distribuidor.

PROCEDIMENTO (Ver esquema do procedimento)

Operações prévias

Todos os reativos devem estar a temperatura ambiente (20-25°C) antes de iniciar-se o ensaio.

Os reativos líquidos devem ser homogeneizados suavemente antes do seu uso.

Diluir 1/10 a solução de lavagem concentrada com água destilada ou deionizada. Para uma placa completa, misturar 50 ml de solução de lavagem concentrada com 450 ml de água. No caso de não utilizar-se uma placa completa, preparar o volume proporcional de solução.

Diluir o conjugado concentrado 1/51 com o diluente do conjugado de acordo com a tabela 1. Para o kit de 1 placa, se for utilizar a placa inteira, adicionar 300 µl de conjugado concentrado diretamente ao frasco que contém 15 ml de diluente do conjugado. **Misturar delicadamente.**

TABELA 1

Tiras requeridas	1	2	4	6	8	10	12
Diluente do conjugado ml	1,0	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0
Conjugado concentrado µl	20	40	80	120	160	200	240

Realização da prova

1. Utilizar somente o número de tiras necessárias para o teste. Reservar 6 pocinhos para o branco e controles. Adicionar 200 µl de diluente de amostra aos pocinhos restantes. Em seguida, pipetar 10 µl de cada amostra nos pocinhos previamente designados.
2. Adicionar 200 µl de controle negativo a 3 pocinhos e 200 µl de controle positivo a 2 pocinhos. **NÃO DILUIR OS CONTROLES. ESTÃO PRONTOS PARA USAR.** Deixar um pocinho vazio para o branco do substrato.
3. Cobrir a placa com uma folha adesiva, **agitar delicadamente** e incubar durante 1 hora a 37°C.
4. Retirar a folha adesiva. Aspirar o conteúdo dos pocinhos e enchê-los completamente (aproximadamente 350 µl), com a solução de lavagem. Repetir o processo de aspiração e lavagem 3 vezes mais. Assegurar que cada coluna de pocinhos esteja em remolho ao menos 15 segundos antes do novo ciclo de aspiração. Após a última lavagem golpear a placa invertida sobre um papel absorvente para eliminar qualquer excesso de líquido nos pocinhos.
5. Transferir 100 µl de conjugado diluído a todos os pocinhos da placa, com exceção do pocinho do branco do substrato.
6. Cobrir a placa com uma folha adesiva e incubar durante 30 minutos a 37°C.
7. Durante os últimos 5-10 minutos desta incubação, preparar a solução de substrato-cromógeno. Se for utilizar toda a placa colocar 280 µl de solução de cromógeno (TMB) diretamente no frasco de tampão substrato (14 ml) e **homogeneizar bem**. Se não for utilizar toda a placa, preparar a quantidade necessária indicada na tabela 2. A solução para uso deve ser incolor; descartar caso se torne azul.

TABELA 2

Tiras requeridas	1	2	4	6	8	10	12
Tampão substrato ml	1,0	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0
Cromógeno (TMB) µl	20	40	80	120	160	200	240

NOTA: O TMB está dissolvido em DMSO. Dado que a temperatura de fusão do DMSO é de 18°C, deixar que o cromógeno alcance a temperatura de 20-25°C para que se descongele completamente e **homogeneizar bem** antes de usar. É normal que o cromógeno apresente cor amarelada.

8. Retirar a folha adesiva. Aspirar e lavar a placa como no item 4.
9. Adicionar 100 µl de substrato-TMB em todos os pocinhos.
10. Incubar sem cobrir durante 30 minutos a temperatura ambiente (20-25°C).
11. Parar a reação pipetando 100 µl de solução de bloqueio em cada pocinho, guardando a mesma seqüência e com os mesmos intervalos observados na adição do substrato-TMB.
12. Ajustar o zero do leitor com o pocinho do branco a 450 nm e ler a absorbância de cada um dos pocinhos, no prazo máximo de 30 minutos. É recomendável fazer leitura bicromática, utilizando filtro de referência de 620 - 630 nm.

Controle de qualidade

Os resultados de um ensaio são válidos se são cumpridos os seguintes critérios:

1. Branco do substrato.
A absorbância obtida deve ser inferior ou igual a 0,100.
2. Média do controle negativo (CNx).
A absorbância de cada controle negativo deve ser igual ou menor que 0,200 depois de subtrair o branco. Se algum dos valores não estiver dentro desta margem, deve-se descartá-lo e recalcular a média. Se forem dois os valores situados fora desta margem, a prova deverá ser repetida.

Exemplo:

Controle negativo	Absorbância
1	0,045
2	0,043
3	0,041
Total	0,129

$$CNx = 0,129/3 = 0,043$$

Neste exemplo não deve ser descartado nenhum valor.

3. Média do controle positivo (CPx).

A média da absorbância dos controles positivos deve ser igual ou superior a 0,600 depois de subtrair o branco. Se a média é inferior a este valor, a análise deverá ser repetida.

Exemplo:

Controle positivo	Absorbância
1	1,536
2	1,551
Total	3,087

$$CPx = 3,087/2 = 1,544$$

Resultados

1. Calcular o valor *cut-off* somando 0,300 à média do controle negativo.

Valor *cut-off* = CNx + 0,300

Exemplo: CNx = 0,043 Valor *cut-off* = 0,043 + 0,300 = 0,343

2. Dividir a absorbância da amostra pelo valor *cut-off*.

- Positivo: relação absorbância/*cut-off* ≥ 1,0
- Negativo: relação absorbância/*cut-off* < 0,9
- Duvidoso: relação absorbância/*cut-off* ≥ 0,9 < 1,0

Interpretação dos resultados

Um resultado positivo é indicativo de infecção por *T. cruzi*. Deve-se tomar em consideração a história clínica do paciente.

Limitações do procedimento

Toda a amostra com um resultado positivo ou duvidoso deve ser retestada por duplicado; se o resultado é repetidamente positivo ou duvidoso, deve-se provar com um outro teste.

Para o correto funcionamento do kit as instruções para uso devem ser seguidas estritamente. Qualquer desvio pode dar origem a resultados aberrantes.

Como em todos os imunoenaios muito sensíveis, existe a possibilidade de resultados positivos que não se repetem.

Um resultado negativo não exclui a possibilidade de infecção por *T. cruzi*.

Características funcionais

Avaliações

O funcionamento do kit **bioelisa CHAGAS** foi avaliado em vários estudos em comparação com outros ensaios comerciais analisando amostras de doadores de sangue e amostras previamente classificadas como positivas ou negativas de anticorpos contra *T. cruzi*.

- Em uma avaliação realizada em um banco de sangue, 3024 amostras de doadores foram testadas em paralelo com os métodos utilizados de rotina para a triagem de anticorpos de Chagas (EIA, HA e IFA). Vinte e uma (21) amostras foram reativas com o **bioelisa CHAGAS**, sete (7) das quais foram confirmadas como positivas. Portanto, a sensibilidade obtida foi de 100% e a especificidade de 99,5%, considerando todas as amostras inicialmente reativas.

- Em uma outra avaliação em banco de sangue, 2723 amostras foram analisadas em paralelo com os métodos utilizados de rotina para a triagem de anticorpos de Chagas (EIA, HA e IFA). Do total, 72 foram reativas com o **bioelisa CHAGAS**. Duas delas foram confirmadas como positivas. Portanto, a sensibilidade obtida foi de 100% e a especificidade na triagem de 97,4%.
- Em um terceiro banco de sangue, 2655 amostras foram analisadas em paralelo com os métodos utilizados de rotina para a triagem de anticorpos de Chagas (EIA, HA e IFA). Destas, 57 amostras foram reativas com o **bioelisa CHAGAS**. Dez (10) delas foram confirmadas como positivas. Nessa avaliação a sensibilidade obtida foi de 100% e a especificidade na triagem foi de 98,2%.
- Um painel de 498 amostras classificadas como positivas (18) ou negativas (480) foi analisado. A sensibilidade obtida foi de 100% e a especificidade de 98,3%.
- Um painel de 115 amostras previamente classificadas como positivas verdadeiras foi ensaiado. Os resultados de todas as amostras foram positivos, obtendo-se uma sensibilidade de 100%.
- Foram analisadas 796 amostras caracterizadas como negativas, das quais 4 apresentaram resultado positivo com o **bioelisa CHAGAS**. Neste estudo a especificidade obtida foi de 99,5%.

Precisão

Reprodutibilidade intra-ensaio:

Os coeficientes de variação obtidos para os valores de absorbância de 24 replicados de uma amostra positiva foram de 2,5%, 4,2% e 3,1% em três lotes estudados.

Reprodutibilidade inter-ensaio:

Três amostras positivas de distintos níveis foram analisadas em 3 ensaios diferentes. Os coeficientes de variação obtidos para os índices absorbância/cut-off das 3 amostras foram 4,6%, 3,5% e 8,7%.

bioelisa: Guia de problemas

Problema	Possíveis causas	Solução
1. Controles fora de validação.	1a. Temperatura, incubação ou pipetagem incorreta.	<i>Verificar o procedimento. Repetir o ensaio.</i>
	1b. Preparação incorreta de reativos, erro de diluição. Reativos não homogeneizados.	<i>Verificar o procedimento. Repetir o ensaio.</i>
	1c. Contaminação cruzada entre controles.	<i>Pipetar cuidadosamente. Não intercambiar as tampas dos frascos. Repetir o ensaio.</i>
	1d. Filtro de leitura incorreto.	<i>Comprovar que o filtro de leitura seja de 450 nm. Se não se usa filtro de referência de 620-630 nm, as absorbâncias aumentam aproximadamente 50 miliunidades.</i>
	1e. Interferência no caminho ótico.	<i>Verificar o leitor. Limpar ou secar o fundo dos pocinhos. Comprovar que não hajam bolhas de ar. Repetir a leitura.</i>
	1f. Foram utilizados componentes de lotes diferentes.	<i>Não utilizar componentes de lotes diferentes já que os mesmos são ajustados para cada lote.</i>
	1g. Reativos vencidos.	<i>Verificar a data de validade do kit e de seus componentes. Não utilizar kits vencidos.</i>
2. Sem cor ou pouca cor ao final do ensaio.	2a. Um ou mais reativos não adicionados ou adicionados em seqüência incorreta.	<i>Verificar o procedimento. Repetir o ensaio.</i>
	2b. Conjugado inativo: má conservação.	<i>Verificar se há contaminação visível (turbidez), verificar o procedimento. Repetir o ensaio.</i>
	2c. Microplaca inativa: conservação incorreta.	<i>Manter sempre as tiras não utilizadas na bolsa de plástico, bem fechada, com o dessecante dentro. Repetir o ensaio.</i>
	2d. Substrato inativo: conservação ou diluição incorreta. Contaminação cruzada com a solução de bloqueio.	<i>Utilizar sempre uma diluição recém preparada de TMB em tampão substrato. Verificar o procedimento. Repetir o ensaio.</i>

bioelisa: Guia de problemas

Problema	Possíveis causas	Solução
3. Demasiada cor em todos os pocinhos da microplaca.	3a. Substrato contaminado, oxidado ou preparado incorretamente.	<i>Comprovar que o substrato preparado seja incolor, descartar o caso se torne azul. Assegurar-se de que o TMB esteja completamente líquido antes de utilizá-lo. Misturar bem o TMB com o tampão substrato. Utilizar frascos ou recipientes descartáveis de plástico ou de vidro lavados com ácido. Repetir o ensaio.</i>
	3b. Reativos contaminados ou preparados incorretamente.	<i>Verificar se há contaminação (aspecto turvo). Comprovar as diluições. Repetir o ensaio.</i>
	3c. Solução de lavagem (1x) contaminada.	<i>Verificar a qualidade da água destilada/deionizada utilizada para preparar a diluição. Repetir o ensaio.</i>
	3d. Lavagem insuficiente ou não uniforme: volume dispensado ou aspiração insuficiente ou não uniforme, número de ciclos de lavagem insuficiente. Lavador contaminado.	<i>Verificar o lavador. Encher totalmente e aspirar completamente os pocinhos. Aumentar o número de ciclos de lavagem. Bater a placa invertida sobre papel absorvente. Repetir o ensaio.</i>
	3e. Foi utilizada solução de lavagem de outro fabricante.	<i>Utilizar somente a solução de lavagem de biokit.</i>
	3f. Diluição incorreta das amostras.	<i>Verificar o procedimento. Repetir o ensaio.</i>
4. Reprodutibilidade pobre ou elevado número de amostras reativas que não se repetem.	4a. Problemas de lavagem.	<i>Ver itens 3c, 3d, 3e.</i>
	4b. Pipetas mal calibradas ou ponteiras mal encaixadas. Técnica de pipetagem incorreta.	<i>Utilizar pipetas calibradas, com ponteiras bem encaixadas. Pipetar cuidadosamente sem fazer bolhas nem salpicar. Repetir o ensaio.</i>
	4c. Reativos muito frios ou não homogeneizados antes de usar.	<i>Deixar os reativos alcançarem a temperatura ambiente e misturá-los bem antes de usar.</i>
	4d. Correntes de ar sobre a microplaca durante as incubações.	<i>Manter a microplaca protegida de correntes de ar.</i>
	4e. Demasiada demora na adição de amostras e/ou reativos. Inconsistência nos intervalos de tempo, bolhas de ar.	<i>Desenvolver uma técnica uniforme e reprodutível.</i>
	4f. Interferência no caminho ótico.	<i>Ver 1e.</i>