



WL Check

Chagas

Para a detecção de anticorpos contra o *Trypanosoma cruzi* em soro, plasma e sangue total

SIGNIFICADO CLÍNICO

A doença de Chagas (tripanosomíase americana), é uma infecção parasitária produzida pelo *Trypanosoma cruzi*.

O diagnóstico de laboratório depende do estágio no qual é encontrada a doença.

Durante a fase aguda, o diagnóstico é efetuado diretamente mediante a comprovação dos parasitos no sangue ou por métodos imunológicos que detectem IgM.

Durante a fase crônica, podem ser utilizados os métodos imunológicos como: hemaglutinação, imunofluorescência, ensaio imunoenzimático ou Western blot. Uma vez que estas provas não reúnem individualmente as condições ótimas de sensibilidade e especificidade, é recomendável o uso de pelo menos duas provas sorológicas diferentes para confirmar a infecção pelo *T. cruzi*.

Nos últimos anos foram desenvolvidas provas rápidas imunocromatográficas baseadas em antígenos recombinantes. Pela sua simplicidade e rapidez, estas provas são uma ferramenta complementar de grande utilidade para ensaios epidemiológicos de campo bem como para o diagnóstico clínico, facilitando a detecção precoce da infecção.

WL Check Chagas é uma prova rápida baseada em uma combinação especial de antígenos recombinantes capazes de detectar a presença de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* em soro, plasma e sangue total.

FUNDAMENTOS DO MÉTODO

WL Check Chagas é um ensaio imunocromatográfico "in vitro" para a detecção qualitativa de anticorpos contra *Trypanosoma cruzi* em soro, plasma e sangue total. A prova consiste em um cassete plástico que contém:

- uma membrana de nitrocelulose sensibilizada, na região de prova "T", com antígenos recombinantes específicos dos estágios epimastigota e tripomastigota de *T. cruzi*.

- um parche impregnado com antígenos recombinantes específicos de *T. cruzi* conjugados a ouro coloidal.

A amostra e o tampão são acrescentados na cubeta de amostra "S" solubilizando e misturando-se com o conjugado de antígenos recombinantes. Em seguida, a mistura migra por capilaridade através da membrana de nitrocelulose. Se a amostra é reativa, os anticorpos anti-*T. cruzi* presentes, formarão um complexo com os antígenos conjugados a ouro coloidal. Este complexo, posteriormente, irá ligar aos antígenos imobilizados na região de prova "T" da membrana de nitrocelulose, formando uma linha de cor rosa-vermelho roxo. A ausência desta linha indica um resultado negativo. Como controle de procedimento, a prova inclui uma região

de controle "C" de cor amarelo que muda a cor rosa-vermelho roxo após a passagem da amostra. A ausência desta linha invalida os resultados.

MATERIAL FORNECIDO

A. Reagente A: cassete plástico composto por uma membrana de nitrocelulose sensibilizada com antígenos recombinantes específicos de *Trypanosoma cruzi* e conjugado de antígenos recombinantes.

B. Reagente B: tampão borato de sódio 50 mM, azida sódica 0,90 g/l, agente tensoativo, pH 8,0.

INSTRUÇÕES DE USO

O material fornecido é pronto para uso.

MATERIAL NECESSÁRIO (não fornecido)

- Micropipeta para medir os volumes indicados.
- Dispositivo descartável de 40 uL para coleta de sangue total capilar (só fornecido em algumas apresentações).
- Pontas descartáveis.
- Relógio alarme ou cronômetro.
- Material para coleta de amostra.
- Lanceta para coleta de amostra.
- Luvas descartáveis, guarda-pó, proteção ocular.
- Recipiente para o descarte de resíduos biológicos.
- Hipoclorito de sódio.

PRECAUÇÕES

- Ler as instruções de uso completamente antes de realizar a prova e seguir as instruções cuidadosamente.
- Não realizar a prova se a embalagem estiver danificada.
- Não utilizar os reagentes ultrapassada a data de vencimento indicada na embalagem.
- Os reagentes são para uso diagnóstico "in vitro".
- A prova fornece um resultado qualitativo e visual. É necessária uma boa fonte de luz para a leitura dos resultados.
- Não misturar reagentes de diferentes lotes.
- Não utilizar reagentes de outra origem.
- Não tocar a membrana de nitrocelulose com os dedos.
- Seguir as práticas de biossegurança quando utilizar as amostras e os reagentes:
 - . Manipular todas as amostras de pacientes como potencialmente infecciosas.
 - . Utilizar luvas, guarda-pó e proteção ocular.
 - . Não pipetar com a boca.
 - . Limpar e desinfetar as salpicaduras de amostras ou reagentes utilizando hipoclorito de sódio (concentração final

5%) ou outro desinfetante apropriado. Inativar o material utilizado em autoclave durante 1 hora a 121°C.

- Evitar a formação de bolhas na cubeta de amostra "S" tanto ao colocar a amostra como o Reagente B.
- Durante a prova, colocar o cassete sobre uma superfície limpa, aplanada e sem vibrações.
- Não agitar o cassete durante a prova.
- O cassete é descartável, não reutilizar. Descartar em recipientes para resíduos com risco biológico.
- O Reagente B contém azida sódica em baixas concentrações como conservador.
- Os reagentes e as amostras devem ser descartados conforme à regulação local vigente.

ESTABILIDADE E INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO

O kit é estável entre 2 e 30°C até a data de vencimento indicada na embalagem. Não congelar. Caso seja armazenado sob refrigeração, deve-se assegurar que o envelope atinja temperatura ambiente antes de se utilizar. Caso contrário será favorecida a umectação.

O cassete deve ser mantido na sua embalagem original fechada. Não abrir o envelope até que esteja pronto para uso.

AMOSTRA

Soro, plasma e sangue total coletado por punção venosa ou punção capilar

a) Coleta: coletar as amostras em forma asséptica e de modo a evitar a hemólise.

- Soro: coletar da maneira habitual. Separar o coágulo dentro de duas horas após à coleta. Pode-se utilizar soro coletado em tubos com acelerador e gel separador.
- Plasma: coletar com EDTA, citrato ou heparina.
- Sangue total (punção venosa): coletar com EDTA, citrato ou heparina.
- Sangue total (punção capilar): coletar com o dispositivo descartável de 40 uL (não fornecido em todas as apresentações). Realizar a prova de imediato. Caso seja utilizado outro dispositivo, é responsabilidade do usuário avaliar o dispositivo para coleta de sangue total capilar.

Coleta de sangue total capilar:

- 1- Coletar a amostra da ponta do dedo médio ou anular. Se necessário aquecer a mão do paciente para aumentar o fluxo de sangue. Utilizar uma toalha quente e úmida ou água quente (< 42°C).
- 2- Limpar o dedo com solução aquosa de isopropanol ao 70% v/v e deixar secar. Restos de isopropanol podem causar a hemólise da amostra.
- 3- Colocar a mão com a palma da mão para acima e sustentar o dedo do paciente firmemente.
- 4- Utilizar uma lanceta nova para cada paciente. Colocar a lanceta perpendicularmente à superfície da pele. Punçar com firmeza a ponta da falange distal do dedo.
- 5- Descartar a lanceta em um recipiente apropriado para objetos pontiagudos e com risco biológico.
- 6- Manter o dedo abaixo da altura do cotovelo e pressionar suavemente a base do dedo em intervalos regulares.

7- Absorver a primeira gota de sangue com uma gaze estéril e descartar em um recipiente apropriado. Isso garante a remoção do líquido tissular da amostra, evitando resultados errôneos.

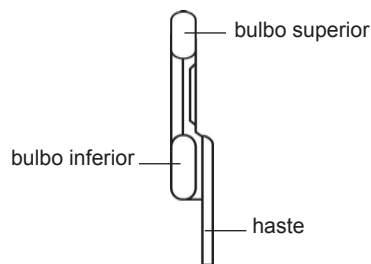
8- Coletar a amostra de sangue com o dispositivo descartável (só fornecido em algumas apresentações). Para isso:

8a- Manter o dispositivo em forma vertical e com um pequeno ângulo de inclinação em relação à superfície da pele. Pressionar o bulbo superior.

8b- Coletar a amostra de sangue para preencher a haste. Para isto, soltar o bulbo superior suavemente evitando a formação de bolhas.

8c- Agitar o dispositivo suavemente tomando cuidado para não espirrar. O excesso de amostra deve ser retido no fundo do bulbo inferior. É muito importante tomar essa precaução para evitar um excesso de sangue.

8d- Pressionar o bulbo superior e descarregar os 40 uL de amostra contidos na haste na cubeta de amostra "S".



b) Estabilidade e armazenamento:

- Soro e plasma: conservar entre 2-10°C. Caso a prova não seja realizada no prazo de 3 dias, conservar a amostra a -20°C. Não é recomendável realizar vários ciclos de congelamento e descongelamento. Isto pode gerar resultados errados. Se utilizar amostras congeladas, as mesmas devem ser homogeneizadas e centrifugadas antes de usar.
- Sangue total (punção venosa): pode ser conservado até 3 dias entre 2-10°C. Não congelar.
- Sangue total (punção capilar): utilizar de imediato. Não congelar.

c) Substâncias interferentes: não foram observadas interferências por:

- . Hemólise: até 1,1 g/dL de hemoglobina.
- . Lipemia: até um equivalente de triglicerídeos de 1500 mg/dL.
- . Bilirrubina: até 30 mg/dL.
- . Ácido ascórbico: até 50 mg/dL.

d) Transporte: caso as amostras devam ser transportadas, embalar conforme as especificações legais referentes ao transporte de material infeccioso.

PROCEDIMENTO

- 1- Os reagentes e as amostras devem estar a temperatura ambiente (18 a 30°C) antes de utilizar.
- 2- Extrair o cassete do envelope de imediato antes de utilizar.

3- Colocar o cassete em uma superfície limpa, aplanada e sem vibrações.

4- Colocar a amostra na cubeta de amostra "S".

Para soro, plasma ou sangue total:

- Colocar 40 uL com micropipeta automática.
- Esperar 10-15 segundo até que seja absorvida a amostra.

- Adicionar 3 gotas (100 uL) de Reagente B na cubeta de amostra "S".

- Iniciar o cronômetro.

Nota: Caso seja utilizado sangue total capilar, utilizar o dispositivo descartável de 40 uL (fornecido em algumas apresentações).

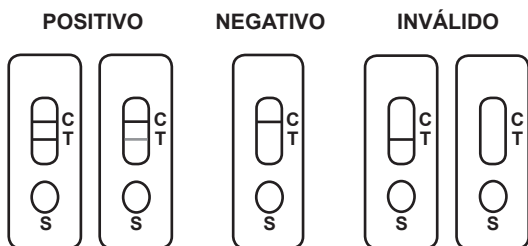
5- Em ambos os casos, ler os resultados entre 25-35 minutos. Não ultrapassar os 35 minutos posto que podem ser obtidos resultados errados. Algumas amostras positivas reagem de imediato enquanto outras reagem mais lentamente dentro do tempo especificado de leitura. Devido às características de algumas amostras, a cor de fundo da membrana pode ser ligeiramente rosa, sem afetar a interpretação dos resultados.

CRITÉRIOS DE VALIDAÇÃO DA PROVA

- O cassete tem uma linha amarela na região de controle "C" para identificar a determinação **WL Check Chagas**.

- Quando realizar a prova, a linha amarela deve mudar para rosa-vermelho roxo. A mudança de cor indica que foi adicionado o volume correto de amostra, que a sua migração foi apropriada e que o procedimento foi realizado corretamente.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS



Resultado Positivo (2 linhas): observam-se 2 linhas rosa-vermelho roxo, uma na região de prova "T" e outra na região de controle "C". A intensidade de cor da linha "T" depende da amostra estudada. Todo cor rosado visível embora seja débil, deve ser interpretado como positivo. O resultado é positivo embora as intensidades de cor das linhas "T" e "C" sejam diferentes.

Resultado Negativo (1 linha): observa-se uma linha rosa-vermelho roxo na região de controle "C". Não aparece linha de cor na região de prova "T".

Resultado inválido: a ausência da linha de cor rosa-vermelho roxo na região de controle "C" invalida o resultado

embora esteja presente ou não a linha rosa-vermelho roxo na região de prova "T". Um resultado inválido, geralmente indica um erro no procedimento ou um problema com a amostra. Com algumas amostras podem aparecer dificuldades como migração incompleta, amostra muito viscosa ou presença de fibrina. Em qualquer caso, revisar o procedimento, centrifugar previamente a amostra e repetir a prova com um novo cassete.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

- **WL Check Chagas** é uma prova para o diagnóstico da infecção por *T. cruzi*. Qualquer resultado obtido com esta prova deve ser conferido por outros métodos e comparado com os dados clínicos do paciente antes de realizar o diagnóstico definitivo.

- Um resultado positivo por **WL Check Chagas** indica a presença de anticorpos anti-*T. cruzi*. O resultado deve ser verificado por outro método. Deve-se lembrar o critério recomendado pelo «Instituto Fátala Chaben» segundo o qual o imunodiagnóstico da infecção deve ser feito pelo menos por dois dos seguintes métodos: imunofluorescência indireta, hemaglutinação indireta e ELISA, devidamente validados pelo Centro Nacional de Referência.

- Um resultado negativo não exclui a possibilidade de infecção por *T. cruzi*. Pode ser obtido um resultado falso negativo em amostras com níveis baixos de anticorpos anti-*T. cruzi* ou em estágios iniciais da infecção. Por isso, é importante ter cuidado na interpretação de um resultado negativo especialmente em pacientes com sintomas clínicos e fatores de risco.

- Podem ser obtidos resultados falsos positivos nas seguintes situações: doenças autoimunes, tuberculose, lupus eritematoso sistêmico, gravidez, vacinação contra a hepatite B e outras imunizações, hemodiálise, doença hepática, outras parasitose como leishmaniose e outras doenças infecciosas diferentes a Chagas (HIV, HTLV, hepatite C, hepatite B, sífilis, etc).

- Podem ser obtidos resultados errados com amostras de soro ou plasma com aspecto turvo devido a contaminação bacteriana ou por ter sido submetidas a vários ciclos de congelamento e descongelamento.

- A utilização de amostras inativadas por calor pode originar resultados errados.

- Não utilizar pooles de amostras ou amostras diluídas.

- Vide Substâncias interferentes em AMOSTRA.

DESEMPENHO

a) Sensibilidade

Sensibilidade Clínica em Painéis de Performance

Em um estudo realizado com diferentes painéis comerciais internacionais, obtiveram-se os seguintes resultados:

- PMT 202 (Anti-*T. cruzi* Performance Panel, Sera Care Life Sciences, USA - BBI Diagnostics): foram detectadas 13 das 14 amostras reativas.

- PP 0407 (Painel de Performance anti-*T. cruzi*, Q Panel, Brasil): foram detectadas 16 das 16 amostras reativas.

- PP 0508 (Painel de Performance anti-*T. cruzi*, Q Panel, Brasil): foram detectadas 16 das 16 amostras reativas.

- PP 0409 (Painel de Performance anti-T. cruzi, Q Panel, Brasil): foram detectadas 16 das 16 amostras reativas.

Sensibilidade com Controles Internacionais:

- VIROTROL® Chagas - Bio-Rad: foi obtido resultado reativo.
- ACCURUN® 190 Controle Positivo de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* (Chagas) - Sera Care Life Sciences: foi obtido resultado reativo.

Sensibilidade clínica em Painéis de amostras reativas anti-T. cruzi

Em um estudo realizado em um painel de 326 amostras reativas por ELISA e hemaglutinação indireta (HAI), a sensibilidade foi 93,87% com um IC_{95%} = 91,11%-96,62%.

Em outro estudo realizado com 83 amostras reativas de crianças provenientes de região endêmica para a infecção por *T. cruzi*, foram encontradas 78 amostras reativas.

Um estudo realizado em um Centro de Referência para o Diagnóstico de Chagas analisou um painel de 72 amostras reativas, no qual foi obtida uma sensibilidade de 98,61% com um IC_{95%} = 92,51%-99,96%.

Outro estudo avaliou em paralelo, 106 amostras reativas de plasmas e sangue total obtidas do mesmo paciente. Em caso dos plasmas, foram detectadas 106 amostras, entando que para a sangue total foram reativas 97 amostras.

a) Especificidade

Em um estudo realizado em 1419 amostras de soros, plasmas e sangue total provenientes de três centros de saúde diferentes, foi obtida uma especificidade de 97,89% com um IC_{95%} = 97,10%-98,67%. Para 200 de estas amostras, foram avaliados em paralelo, soro e plasma do mesmo paciente.

Para 17 de estas 200 amostras também foi avaliado sangue total obtida por punção capilar. Com todos os tipos de amostras foram obtidos resultados negativos.

Em outro estudo realizado com 313 amostras provenientes de banco de sangue, foi obtida uma especificidade de 98,08% com um IC_{95%} = 96,40%-99,76%.

Também foi estudada a possibilidade de obter reações cruzadas analisando amostras provenientes de 257 indivíduos com diferentes condições clínicas que podem originar reações inespecíficas para a prova **WL Check Chagas**. Estas condições incluem mulheres grávidas, pacientes hemodialisados, pacientes com enfermidades autoimunes ou enfermidades infecciosas diferentes a Chagas (HIV, HTLV, hepatite C, hepatite B, sífilis, outras). Para esta população, a especificidade foi 98,44% com um IC_{95%} = 96,73% - 100,0%. Nesta amostragem foram incluídos 12 plasmas de pacientes com leishmaniose cutânea e 12 com leishmaniose mucocutânea. **WL Check Chagas** não apresentou reações cruzadas por leishmaniose em nenhuma das amostras avaliadas.

c) Precisão

Foi avaliada a precisão da prova seguindo o protocolo EP5-A recomendado pelo CLSI (ex NCCLS). Os estudos foram realizados com 4 amostras positivas com diferentes níveis de reatividade e com 1 amostra negativa. Foram realizados 2 ensaios diários avaliando cada amostra por duplicado durante 20 dias. Os resultados foram lidos após 25 minutos em forma visual por 3 operários independentes e em forma instrumental utilizando um leitor imunocromatográfico.

As amostras positivas e negativas foram identificadas corretamente no 100% dos casos.

| Interpretação instrumental | Linha T | | | | | Linha C | | | | |
|----------------------------|------------|--------------|--------|-------|--------|------------|--------------|-------|-------|-------|
| | Média (DO) | Intra-ensaio | | Total | | Média (DO) | Intra-ensaio | | Total | |
| | | P | CV | P | CV | | P | CV | P | CV |
| Amostra positiva 1 | 0,590 | 0,068 | 11,61% | 0,067 | 11,38% | 0,833 | 0,076 | 9,18% | 0,079 | 9,45% |
| Amostra positiva 2 | 0,437 | 0,047 | 10,86% | 0,050 | 11,36% | 0,851 | 0,062 | 7,30% | 0,059 | 6,96% |
| Amostra positiva 3 | 0,401 | 0,056 | 13,87% | 0,054 | 13,57% | 0,873 | 0,066 | 7,51% | 0,066 | 7,54% |
| Amostra positiva 4 | 0,145 | 0,020 | 13,74% | 0,021 | 14,45% | 0,846 | 0,061 | 7,25% | 0,071 | 8,34% |
| Amostra negativa | (-) | NC | NC | NC | NC | 0,812 | 0,061 | 7,47% | 0,078 | 9,64% |

N = 80; (-) = não reativo por leitura visual; NC = Não Corresponde

APRESENTAÇÃO

- 25 determinações (Cód. 1690011)

REFERÊNCIAS

- Ministerio de Salud y Acción Social, Instituto Nacional de Parasitología "Doctor Mario Fatala Chabén". Normas para el diagnóstico de la infección chagásica - Resolución ministerial 523/97, 1998.
- WHO. Control of Chagas disease. Ginebra: WHO Press, 2002.
- OMS. Reporte sobre la enfermedad de Chagas. Grupo de

- trabajo científico 17-20 de abril de 2005. Guhl F, Lazdins-Helds J, editores. Buenos Aires - Argentina. http://www.who.int/tr/publications/publications/pdf/swg_chagas.pdf.
- Centers for Disease Control and Prevention - Chagas Disease. <http://www.cdc.gov/chagas>.
- Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices; Approved Guideline. EP5-A, Vol. 19, Nº 2, NCCLS.
- Interference testing in Clinical Chemistry. Approved Guideline. EP7-A, Vol. 22, Nº 27, CLSI (ex NCCLS).
- User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline. EP12-A, Vol. 22, Nº 14, NCCLS.

- Evaluation of Stability of "in vitro" Diagnostic Reagents. Approved Guideline. EP-25A, Vol. 29, N° 20, CLSI (ex NCCLS).
- Procedures and Devices for the Collection of Diagnostic Capillary Blood Specimens; Approved Standard, 5ª Edición. H4-A5, Vol. 24, N° 21, CLSI (ex NCCLS).

SÍMBOLOS

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



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

| | |
|--|---|
| | Representante autorizado na Comunidade Européia |
| | Uso médico-diagnóstico "in vitro" |
| | Conteúdo suficiente para <n> testes |
| | Data de validade |
| | Limite de temperatura (conservar a) |
| | Não congelar |
| | Risco biológico |
| | Volume após da reconstituição |
| | Conteúdo |
| | Número de lote |
| | Elaborado por: |
| | Nocivo |
| | Corrosivo / Caústico |
| | Irritante |
| | Consultar as instruções de uso |
| | Calibrador |
| | Controle |
| | Controle Positivo |
| | Controle Negativo |
| | Número de catálogo |



Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina

UR101124