

MS 10310030077

Imuno-CON CHAGAS

Kit para determinação de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* no soro humano por imunofluorescência indireta.

An indirect immunofluorescence kit for the detection of anti-*Trypanosoma cruzi* antibody in human serum.

Kit para determinação de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* en el suero humano por inmunofluorescencia indirecta.

REF 1460-I: 60 determinações / determinations / determinaciones

REF 14100-I: 100 determinações / determinations / determinaciones

REF 14200-I: 200 determinações / determinations / determinaciones



WAMA Diagnóstica
Rua Aldo Germano Klein, 100 - CEAT
CEP 13560-971 - São Carlos - SP - Brasil
Fone 55 16 3377.9977 / Fax 55 16 3377.9970
www.wamadiagnostica.com.br

EC|REF
OBELIS SA
Avenue de Tervueren, 34 bte 44, 1040
Brussels - Belgium / www.obelis.net

PORTUGUÊS

IMPORTÂNCIA CLÍNICA

A doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana é uma infecção endêmica, de evolução essencialmente crônica, causada por um protozoário, o *Trypanosoma cruzi*, e transmitida ao homem por um inseto, o triatomíneo. Imunologicamente, 3 estágios podem ser considerados: agudo, latente ou indeterminado e crônico. Na fase aguda verificam-se febre, miocardiopatia, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia e parasitemia. A multiplicação intracelular dos parasitas nos músculos lisos e estriados e células do sistema retículo endotelial acarreta a formação de pseudocistos. Na fase intermediária ou latente não há sintomas. A doença pode evoluir para a fase crônica com sinais de miocardiopatia, degeneração das células ganglionares do sistema nervoso central e periférico e hipertrofia de certos órgãos, tais como esôfago e cólon, constituindo os mega.

Pelos altos índices de prevalência e morbidade, ela se tornou um dos maiores problemas de saúde pública em toda a América Latina.

Como a minoria dos indivíduos com sorologia positiva para *T. cruzi* desenvolve evidências clínicas da doença crônica, as informações prestadas pelo laboratório clínico tomam-se decisivas no diagnóstico etiológico.

Vários são os métodos utilizados para o diagnóstico da doença de Chagas: reação de fixação de complemento, aglutinação, precipitação, imunofluorescência, hemaglutinação e imunoenzimático.

Destes, os mais utilizados são as reações de hemaglutinação indireta (HA), as reações de imunofluorescência indireta (IFI) e os imunoenzimáticos (ELISA).

PRINCÍPIO DO MÉTODO

Os anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* presentes no soro ligam-se ao antígeno fixado na lâmina e são revelados por uma antiagmaglobulina marcada com isotiocianato de fluoresceína.

APRESENTAÇÃO DO KIT

REF 1460-I (60 determinações)

- Lâminas com 6 áreas reativas com suspensão de *Trypanosoma cruzi* (10 lâminas)
- Antiagmaglobulina G humana marcada com isotiocianato de fluoresceína (5ml)
- Tampão fosfato-salino (PBS) 20x concentrado (3 x 50ml)
- Glicerina tamponada (4ml)
- Azul de Evans (2ml)
- Soro controle positivo (1ml)
- Soro controle negativo (1ml)
- Laminulas (10 unidades)
- Instruções para uso

REF 14100-I (100 determinações)

- Lâminas com 10 áreas reativas com suspensão de *Trypanosoma cruzi* (10 lâminas)
- Antiagmaglobulina G humana marcada com isotiocianato de fluoresceína (5ml)
- Tampão fosfato-salino (PBS) 20x concentrado (3 x 50ml)
- Glicerina tamponada (4ml)
- Azul de Evans (2ml)
- Soro controle positivo (1ml)
- Soro controle negativo (1ml)
- Laminulas (10 unidades)
- Instruções para uso

REF 14200-I (200 determinações)

- Lâminas com 10 áreas reativas com suspensão de *Trypanosoma cruzi* (20 lâminas)
- Antiagmaglobulina G humana marcada com isotiocianato de fluoresceína (2x5ml)
- Tampão fosfato-salino (PBS) 20x concentrado (6 x 50ml)
- Glicerina tamponada (2x4ml)
- Azul de Evans (2x2ml)
- Soro controle positivo (2x1ml)
- Soro controle negativo (2x1ml)
- Laminulas (20 unidades)
- Instruções para uso

PREPARAÇÃO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

• **LÂMINAS COM SUSPENSÃO DE *TRYPANOSOMA CRUZI* (1):** deixá-las em temperatura ambiente antes de retirá-las do envelope. Estáveis em geladeira (2-8°C), até a data do vencimento.

• **ANTIGAMAGLOBULINA HUMANA (IgG) MARCADA (2):** pronta para uso. Estável em geladeira (2-8°C), até a data do vencimento. Proteger da luz. Contém azida sódica 0,095%.

• **TAMPÃO FOSFATO-SALINO (PBS) (3):** diluir o PBS concentrado 1/20 (Ex.: 10ml de PBS + 190ml de água destilada ou deionizada). Conservar em geladeira, em recipiente limpo e bem vedado. Desprezar a solução se ocorrer mudança do pH ou turvação. Estável até a data do vencimento. Obs.: Caso ocorra cristalização do PBS antes da sua diluição, colocar em banho-maria 37°C até a completa dissolução dos cristais.

• **GLICERINA TAMPONADA (4):** pronta para uso. Estável em geladeira (2-8°C), até a data do vencimento.

• **AZUL DE EVANS (5):** pronto para uso. Estável em geladeira (2-8°C), até a data do vencimento. Contém azida sódica 0,095%.

• **SORO CONTROLE POSITIVO (6):** pronto para uso. Estável em geladeira (2-8°C) até a data do vencimento. Contém azida sódica 0,095%.

• **SORO CONTROLE NEGATIVO (7):** Pronto para uso. Estável em geladeira (2-8°C) até a data do vencimento.

Obs.: O kit mantém o mesmo desempenho após a primeira utilização e é estável até a data de validade descrita no rótulo, desde que seja mantida temperatura indicada (2-8°C).

AMOSTRAS

Soro livre de hemólise, lipemia e contaminação. Os soros podem ser conservados em geladeira (2-8°C) até 72 horas. Para um tempo maior, devem ser guardados em freezer a -20°C. Evitar repetidos congelamentos e descongelamentos.

MATERIAL NECESSÁRIO, MAS NÃO FORNECIDO

- Microscópio de fluorescência
- Pipetas sorológicas
- Jarra de Coplin ou similar
- Tubos e rack
- Água destilada ou deionizada
- Frasco para 1 litro
- Câmara de incubação
- Papel absorvente

PROCEDIMENTO

- Inativar o soro por 30 minutos a 56°C.
- Diluir os soros desconhecidos a 1/30 (sugere-se 50 µl do soro + 1,45ml de PBS).
- Deixar a(s) lâmina(s) atingir(em) a temperatura ambiente por 15 minutos, antes de retirá-la(s) do envelope. Removê-la(s), sem tocar no substrato, rotulá-la(s) e colocá-la(s) em câmara úmida.
- Pingar 1 gota dos controles positivo (6) e negativo (7), **sem diluir**, nas áreas destinadas aos controles da(s) lâmina(s). Evitar transbordar as áreas.
- Pingar 1 gota dos soros desconhecidos, diluídos 1/30, nas áreas restantes, evitando transbordar, aproximadamente 50µl.
- Incubar na câmara úmida por 30 minutos em temperatura ambiente.
- Remover a(s) lâmina(s) da câmara úmida. Segurá-la(s) por uma extremidade e lavá-la(s) com aproximadamente 10ml de tampão fosfato-salino (PBS) (3). Usando uma pisseta, dirigir o PBS pela borda longitudinal da lâmina, tendo o cuidado de não atingir diretamente as áreas reativas, evitando, com isso, prejudicar o substrato. Colocar a(s) lâmina(s) em uma jarra de Coplin ou similar e lavá-la(s) 3 vezes com PBS, 5 minutos cada vez, agitando suavemente o Coplin algumas vezes durante cada lavagem.
- Remover a(s) lâmina(s) do Coplin, uma de cada vez. Tirar o excesso de PBS sacudindo-a(s) sobre papel absorvente. Secar em torno das áreas reativas e ir **IMEDIATAMENTE** para a etapa 9 para não secar o local da reação.
- Retornar à câmara úmida. Pingar 1 gota da antiagmaglobulina marcada em cada área da(s) lâmina(s), tendo o cuidado de recobri-la(s) totalmente.
- Incubar na câmara úmida por 30 minutos, em temperatura ambiente,

protegendo do excesso de luz.

11. Remover a(s) lâmina(s) da câmara úmida. Segurá-la(s) por uma extremidade e lavá-la(s) com aproximadamente 10ml de tampão fosfato-salino (PBS) (3). Usando uma pisseta, dirigir o PBS pela borda longitudinal da(s) lâmina(s), tendo o cuidado de não atingir diretamente as áreas reativas, evitando, com isso, prejudicar o substrato. Colocar a(s) lâmina(s) em uma jarra de Coplin ou similar e lavá-la(s) 3 vezes com PBS, 5 minutos cada vez, agitando suavemente o Coplin algumas vezes durante cada lavagem. Pingar 2 a 3 gotas de azul de Evans (5) no Coplin desta última lavagem.

12. Remover a(s) lâmina(s) do Coplin, uma de cada vez. Tirar o excesso de PBS sacudindo-a(s) sobre papel absorvente. Secar em torno das áreas reativas e ir **IMEDIATAMENTE** para a etapa 13 para não secar o local da reação.

13. Pingar 3 a 4 gotas de glicerina tamponada (4) entre as áreas reativas. Cobrir a(s) lâmina(s) com lamínula(s) evitando a formação de bolhas. Secar o excesso de glicerina com papel absorvente. Limpar o dorso da lâmina.

14. Ler em microscópio de fluorescência. É conveniente fazer a leitura no mesmo dia. Entretanto, no caso de não ser possível, conservá-la(s) na geladeira (2-8°C), protegida(s) da luz e lê-la(s) no dia seguinte. A glicerina não deve secar. Se isto ocorrer colocar mais glicerina.

RESULTADO DAS LEITURAS

Reação Negativa: AUSÊNCIA de fluorescência amarelo-esverdeada em todo o contorno do *Trypanosoma cruzi*. Os parasitas exibem uma coloração avermelhada.

Reação Positiva: PRESENÇA de fluorescência amarelo-esverdeada característica em todo o contorno do *Trypanosoma cruzi*.

OBSEVAÇÃO: Examinar sempre os controles positivo e negativo para controle da reação.

INTERPRETAÇÃO

Soros que dão reação negativa são informados como **NÃO REAGENTES** e significam indivíduos não parasitados. Soros que dão reação positiva são informados como **REAGENTES** e significam indivíduos parasitados pelo *Trypanosoma cruzi*.

NOTA: para uma maior segurança na pesquisa de anticorpos anti-*T. cruzi*, é recomendável a associação de mais de um tipo de teste, buscando uma maior sensibilidade e possibilidade de confronto de resultados. A WAMA Diagnóstica produz o **Kit Imuno-HI CHAGAS** por hemaglutinação indireta e o **Imuno-ELISA CHAGAS** por enzimaímunossensaio.

DESEMPENHO DO TESTE

O Imuno-CON Chagas da WAMA Diagnóstica apresentou uma sensibilidade de 100% utilizando-se 158 amostras verdadeiramente positivas. Em 261 amostras verdadeiramente negativas, não foram encontrados resultados falso positivo. Apenas em 5 amostras observou-se fluorescência inespecífica, conferindo ao Imuno-CON Chagas da WAMA Diagnóstica uma especificidade de 100%.

PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS

- Reagentes somente para uso diagnóstico *in vitro*.
- O kit deve ser conservado em geladeira entre 2-8°C.
- A conservação das lâminas pode ser feita selando as bordas da lamínula com esmalte de unha e guardando-as no escuro entre 2-8°C por, no máximo, 2 meses.

4. Como se emprega azida sódica a 0,095% como conservante, o descarte dos reativos deve ser acompanhado de grandes volumes de água para evitar o acúmulo de resíduos de azida nos encanamentos, pois esta pode reagir com chumbo ou cobre formando sais altamente explosivos. Além disso, a azida é tóxica, quando ingerida.

5. Todos os materiais humanos usados na preparação dos controles foram testados, com resultados negativos para anticorpos anti-HIV, anti-HCV e antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), porém, como nenhum método diagnóstico oferece completa segurança da ausência destes e de outros agentes infecciosos, recomenda-se tratar os soros controles como materiais potencialmente infecciosos.

6. Não substituir componentes deste kit com o de outros fabricantes, nem usar componentes de lotes e códigos diferentes.

7. Não usar fora do prazo de validade.

8. Descarte o material conforme regulamentações locais.

9. Utilizar manutenção periódica do microscópio, pois a extrapolação da vida útil da lâmpada poderá prejudicar a análise do resultado.

10. Seguir as Boas Práticas Laboratoriais (BPLS) na conservação, manuseio e descarte dos materiais.

TERMO DE GARANTIA

A WAMA Diagnóstica garante a troca deste conjunto diagnóstico, desde que o mesmo esteja dentro do prazo de validade e que seja comprovado por sua assessoria técnica que não houve falhas na execução, manuseio e conservação deste produto. A WAMA e seus distribuidores não se responsabilizam por falhas no desempenho do kit sob essas condições.

ENGLISH

SUMMARY

Chagas disease or American Trypanosomiasis is an endemic and chronic disease. Its pathogenic agent is a flagellate protozoan called *Trypanosoma cruzi* which is transmitted to humans by a bug, triatominae.

3 stages can be present: acute, latent or indetermined and chronic.

The acute phase can present manifestations that include fever, myocardiopathy, lymphadenopathy, hepatoesplenomegaly and parasitemia. Pseudocyst is formed after the intracellular multiplication of parasite on muscles and on cells of endothelial reticulum system.

Latent and intermediary stages are asymptomatic. The disease can evolve for

the chronic phase with manifestations of myocardiopathy, degeneration of ganglion cells of peripheral and central nervous system, hypertrophy and dilatation of some organs such as oesophagus and colon.

Chagas disease remains a major health problem in many Latin American countries because the high numbers of deaths.

As the minority of patients presenting positive sorology for *T. cruzi* develop clinical evidence for chronic disease, information provided by the laboratory has a decisive and fundamental role for etiologic diagnostic.

Chagas disease methods are: Complement fixation, agglutination, precipitation, immunofluorescence, hemagglutination and ELISA from which the most used are indirect hemagglutination (HA), indirect immunofluorescence (IFI) and ELISA.

PRINCIPLE OF THE METHOD

Antibodies anti-*Trypanosoma cruzi* present in the serum bind to an antigen fixed on slide, a fluorescein-labeled, anti-human IgG conjugate (anti-human globulin labelled with FITC) is used to visualize the reaction.

KIT PRESENTATION

REF 1460-I (60 determinations)

- 6-well *Trypanosoma cruzi* slide (10 slides)
- Fluorescein-labelled, anti-human IgG conjugate (5ml)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) 20x (3 x 50ml)
- Mounting Medium (4ml)
- Evans Blue (2ml)
- Positive control serum (1ml)
- Negative control serum (1ml)
- Coverslips (10 units)
- Instructions for use

REF 14100-I (100 determinations)

- 6-well *Trypanosoma cruzi* slide (10 slides)
- Fluorescein-labelled, anti-human IgG conjugate (5ml)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) 20x (3 x 50ml)
- Mounting Medium (4ml)
- Evans Blue (2ml)
- Positive control serum (1ml)
- Negative control serum (1ml)
- Coverslips (10 units)
- Instructions for use

REF 14200-I (200 determinations)

- 10-well *Trypanosoma cruzi* slides (20 slides)
- Fluorescein-labelled, anti-human IgG conjugate (2x5ml)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) 20x (6 x 50ml)
- Mounting Medium (2x4ml)
- Evans Blue (2x2ml)
- Positive serum control (2x1ml)
- Negative serum control (2x1ml)
- Coverslips (20 units)
- Instructions for use

STABILITY AND STORAGE

• TRYPANOSOMA CRUZI SLIDE (1):

Let pouch equilibrate room temperature, then remove slide from the pouch. Stable if stored at 2-8°C up to expiration date.

• **FLUORESCIN-LABELED, ANTI-HUMAN IgG CONJUGATE (2):** Ready for use. Stable if stored at 2-8°C up to expiration date. Contains sodium azide 0,095%.

• BUFFERED SALINE (PBS) (3):

Dilute PBS 1:20 (Ex.: 10ml of PBS + 190ml of distilled or deionized water). Stable up to expiration date if stored at 2-8°C in a clean and sealed container. Discard if turbidity or changing on pH is present.

Obs.: In case PBS crystallization is present before the dilution, keep it in water bath at 37°C up to a complete crystal dissolution.

• **MOUNTING MEDIUM (4):** Ready for use. Stable if stored at 2-8°C up to expiration date. Contains sodium azide 0,095%.

• **EVANS BLUE (5):** Ready for use. Stable if stored at 2-8°C up to expiration date.

• **POSITIVE CONTROL SERUM (6):** Ready for use. Stable up to expiration date.

• **NEGATIVE SERUM CONTROL (7):** Ready for use. Stable up to expiration date.

Obs.: Kit presents results after its first handling and it is stable up to expiration date if stored at 2-8°C.

SPECIMEN COLLECTION

Only serum specimens should be used for this procedure. Grossly haemolysed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere in the performance of this test and should not be used. Store serum at 2-8°C up to 72 hours. For long time storage, serum should be stored at -20°C. Avoid repeated thawing and freezing cycles.

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Fluorescence microscope
- Serological pipette
- Coplin jar or similar
- Test tubes and rack
- Distilled or deionized water
- 1 liter container
- Incubation chamber
- Paper towel

PROCEDURE

- Inactivate serum for 30 minutes at 56°C.

Unknown serum 1:30 (suggestion: 50µl of serum + 1.45ml of PBS).
Pour the pouch equilibrated to room temperature for 15 minutes, then remove the slide from the pouch. Carefully remove the slide without touching on the slide. Label it and store into moisture chamber.

1 drop of positive control(6) and negative (7), **undiluted**, in the control Avoid overfilling the wells.

1 drop (50µl) of unknown serum, 1:30 dilution, in the remaining wells. overfilling the wells.

Substrate slide for 30 minutes at room temperature. Hold the slide at tab end and with 10ml (PBS) (3). With a pipette, lead PBS by the longitudinal edge of the slide. Be sure not to touch on the reagent wells to avoid damaging the slide. Transfer the slide into Coplin jar or similar and rinse it three times with PBS for 5 minutes each time. Gently shake the jar during rinsing.

Remove the slide from Coplin jar, one by one. Blot the edge of the slide on a towel to remove PBS. Dry around reactive wells. To prevent slide from going IMMEDIATELY to step 9.

Remove the slide back to incubation chamber. Apply 1 drop of Fluorescein-anti-human IgG conjugate on each well. Be sure to fill the well completely.

Substrate slide for 30 minutes at room temperature. Protect from light. Remove the slide from incubation chamber. Hold the slide at tab end and with 10 ml of PBS(3). With a pipette, lead PBS by the longitudinal edge of the slide. Be sure not to touch on the reagent wells to avoid damaging the slide. Transfer the slide into Coplin jar or similar and rinse it three times with PBS for 5 minutes each time. Gently shake the jar. Add 2 to 3 drops of Evans Blue in Coplin on the last rising.

Remove slide from Coplin jar, one by one. Blot the edge of the slide on a towel to remove PBS excess. Dry around reactive wells. To prevent from drying, go IMMEDIATELY to step 13.

Apply 3 to 4 drops of Mounting Medium (4) on reactive wells. Cover slips with tape avoiding bubbles. Dry Mounting Medium excess with a paper towel. The slide reverse.

The slide must be read under a fluorescence microscope as soon as possible. However, in case the reading is not possible, store the slide at 2-8°C, protected from light and read the following day. Mounting Medium should not dry, otherwise, apply more.

READING
Positive: Presence of yellow-greenish fluorescence on all Trypanosoma cruzi outline. Parasites are seen by a redish color.

NEGATIVE
Absence of a typical yellow-greenish fluorescence on all Trypanosoma cruzi outline.

CAUTION: Always check positive and negative controls for reaction purposes.

PRETESTING
A positive/negative reaction is regarded as NEGATIVE, meaning the patient has no parasites. Serum presenting positive reaction is regarded as POSITIVE, meaning patients with Trypanosoma cruzi parasites.

No diagnosis should be based on a single serologic test, including serologic tests for antibody research, so it is advisable that additional tests be performed for higher sensitivity and for comparison of the results. WAMA Diagnostics manufactures **Imuno-HAI CHAGAS** for indirect hemagglutination and **Imuno-ELISA CHAGAS**.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS
Sensitivity: It was evaluated 158 positive specimens. Among 261 negative specimens, it was not found any false positive. Only 5 specimens showed an unspecific fluorescence. This confers to Imuno-Con from WAMA Diagnostics 100% of specificity.

PRECAUTIONS AND WARNINGS
In vitro diagnostic use only.
The kit should be stored in refrigerator at 2-8°C.
Seal the cover slip edge with nail varnish and store in refrigerator at 2-8°C in a dark room for 2 months.
Sodium Azide 0.095% is used and it can react with lead and copper plumbing and highly explosive metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. Sodium azide is toxic if ingested.
Human components have been tested for HBsAg, anti-HIV, anti-HCV and are negative. However, this does not assure the absence of these and other infectious diseases. All human components should be handled as potentially hazardous.

Do not interchange kit components with those from sources other than the code number from WAMA DIAGNOSTICA.
Do not use components beyond their expiration date.
Always use in accordance with local regulations.

Periodical maintenance of the microscope is recommended since expired lenses may interfere in the result analysis.
Follow the good laboratory practices (GLP) related to storage, dispensing and material disposal.

DISCONTINUATION
This diagnostic kit replaces this kit since it is not beyond its expiration date. The discontinued kit must be evaluated by Wama's technical support. The discontinued kit will be invalid and kit will not be replaced if technical support finds evidence that running, handling and storage were not properly followed.

ESPAÑOL

IMPORTANCIA CLÍNICA

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es una infección endémica de evolución esencialmente crónica, causada por un protozooario, *Trypanosoma cruzi*, y transmitida por un insecto, el triatomeo.

Inmunológicamente, 3 etapas pueden ser consideradas: aguda, latente o indeterminada y crónica. En la fase aguda, verificase fiebre, miocardiopatía, linfadenopatía, hepatoesplenomegalia y parasitemia. La multiplicación intracelular de los parásitos en los músculos lisos y estriados y células del sistema retículo endotelial acarrea la formación de pseudocyst. En la fase intermedia o latente no hay síntomas. La enfermedad puede evolucionar para la fase crónica con señales de miocardiopatía, degeneración de las células ganglionares del sistema nervoso central y periférico, e hipertrofia y dilatación de ciertos órganos como el estomago, colon, constituyendo los megas. Por los altos índices de prevalencia y morbidad de ellas se tornó un de los mayores problemas de salud pública en toda América latina.

Como en la minoría de los individuos con suerología positiva para *T.cruzi* desarrolla evidencias clínicas de la enfermedad crónica, así informaciones prestadas por el laboratorio clínico toman se decisivas en el diagnóstico etiológico.

Varios son los métodos utilizados para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas: reacción de fijación de complemento, aglutinación, precipitación, inmunofluorescencia, hemaglutinación e inmunoenzimático.

De esos, los mas utilizados son las reacciones de hemaglutinación indirecta (HAI) y las reacciones de inmunofluorescencia indirecta (IFI) e inmunoenzimáticas (ELISA).

PRINCIPIO DEL MÉTODO

Los anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* presentes en el suero se ligan al antígeno fijado en la lamina y son revelados por una antigamaglobulina marcada con isotiocianato de fluoresceína.

PRESENTACION DE KIT

REF 1460-I (60 determinaciones)

- Laminas con 6 áreas reactivas con suspension de *Trypanosoma cruzi* (10 laminas)
- Antigamaglobulina G humana marcada con isotiocianato de fluoresceína (5ml)
- Tapón fosfato-salino (PBS) 20x concentrado (3x50ml)
- Glicerina taponada (4ml)
- Azul de Evans (2ml)
- Suero control positivo (1ml)
- Suero control negativo (1ml)
- Laminuelas (10 unidades)
- Instrucciones para el uso

REF 14100-I (100 determinaciones)

- Laminas con 10 áreas reactivas con suspension de *Trypanosoma cruzi* (10 laminas)
- Antigamaglobulina G humana marcada con isotiocianato de fluoresceína (5ml)
- Tapón fosfato-salino (PBS) 20x concentrado (3x50ml)
- Glicerina taponada (4ml)
- Azul de Evans (2ml)
- Suero control positivo (1ml)
- Suero control negativo (1ml)
- Laminuelas (10 unidades)
- Instrucciones para el uso

REF 14200-I (200 determinaciones)

- Laminas con 10 áreas reactivas con suspension de *Trypanosoma cruzi* (20 laminas)
- Antigamaglobulina G humana marcada con isotiocianato de fluoresceína (5ml)
- Tapón fosfato-salino (PBS) 20x concentrado (6x50ml)
- Glicerina taponada (2x4ml)
- Azul de Evans (2x2ml)
- Suero control positivo (2x1ml)
- Suero control negativo (2x1ml)
- Laminuelas (20 unidades)
- Instrucciones para el uso

PREPARACION Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

Laminas con suspensión de *Trypanosoma cruzi* (1): dejar en temperatura ambiente antes de retirálas del sobre. Estables en nevera (2-8°C), hasta la fecha de caducidad.

Antigamaglobulina humana (IgC) marcada (2): lista para el uso. Estable en nevera (2-8°C), hasta a fecha de caducidad. Proteger de la luz. Contiene azida sódica 0,095%.

Tapón fosfato-salino (PBS) (3): diluir o PBS concentrado 1/20 (Ejemplo: 10ml de PBS + 190ml de agua destilada o deionizada). Conservar en nevera, en recipiente limpio y bien vedado. Desprezar la solución si ocurre cambios del turbación. Estable hasta la fecha de caducidad. Obs.: Caso ocurra cristalización del PBS antes de su dilución, colocar en remojo 37°C hasta la completa disolución de los cristales.

Glicerina taponada (4): lista para el uso. Estable en nevera (2-8°C), hasta la fecha de caducidad. Contiene azida sódica 0,095%.

Azul de Evans (5): listo para el uso. Estable en nevera (2-8°C), hasta la fecha de caducidad. Contiene azida sódica 0,095%.

Suero control positivo (6): listo para el uso. Estable hasta la fecha de caducidad. Contiene azida sódica 0,095%.

Suero control negativo (7): listo para el uso. Estable hasta la fecha de

caducidad. Contiene azida sódica 0,095%.

Obs.: El kit mantiene el mismo desempeño después del primer uso, y es estable hasta la fecha de caducidad desde que sea mantenido en la temperatura de 2-8°C.

MUESTRAS

Suero libre de hemolise, lipemia y contaminación. Los sueros pueden ser conservados en nevera (2-8°C) hasta 72 horas. Para un tiempo mayor, deben ser guardados en congelador -20°C. Evitar repetidos congelamientos e descongelamientos.

MATERIAL NECESARIO, PERO NO FORNECIDO

- Microscopio de fluorescencia
- Pipetas suerológicas
- Jarra de Coplin o similar
- Tubos y rack
- Agua destilada o deionizada
- Frasco para 1 litro
- Cámara para incubación
- Papel absorbente

PROCEDIMIENTO

1. Inactivar el suero por 30 minutos a 56°C.

2. Diluir los sueros desconocidos a 1/30 (se sugiere 50µl del suero + 1,45ml de PBS).

3. Dejar las laminas atingieren la temperatura ambiente por 15 minutos, antes de retirálas del sobre. Removerlas, sin tocar el sustrato, rotularlas y colócalas en camera húmeda.

4. Pingar 1 gota de los controles positivo (6) y negativo (7), sin diluir, en las áreas destinadas a los controles de las laminas. Evitar transbordar en el área.

5. Pingar 1 gota de los sueros diluidos 1/30, en áreas restantes, evitando transbordar, aproximadamente 50µl.

6. Incubar en la camera húmeda por 30 minutos en temperatura ambiente.

7. Remover la lamina (s) de la Cámara húmeda. Aguantar por una extremidad y aclarar con aproximadamente 10ml de tapón fosfato salino (PBS) (3). Usando una pipeta, dirigir el PBS por la borda longitudinal de la lamina, teniendo el cuidado de no atingir el área reactiva, evitando, con eso, perjudicar el sustrato. Colocar las laminas en una jarra de Coplin, o similar y lavar 3 veces con PBS, 5 minutos cada vez, agitando suavemente el Coplin algunas veces durante cada aclaración.

8. Remover las laminas del Coplin, una de cada vez. Quitar el exceso de PBS sacudiendo sobre papel absorbente. Secar en torno del área reactiva pasar inmediatamente para la etapa 9 para no secar el local de la reacción.

9. Retornar a la cámara húmeda. Pingar 1 gota de antigamaglobulina marcada en cada área de la lamina, teniendo el cuidado de cubrir la totalmente.

10. Incubar en la cámara húmeda por 30 minutos, en temperatura ambiente, protegiendo do exceso de luz.

11. Remover las laminas de la camera húmeda. Aguantarlas por una extremidad y aclararlas con aproximadamente 10 ml de tapón fosfato-salino (PBS) (3). Usando una pipeta, dirigir o PBS por la borda longitudinal de las laminas, teniendo el cuidado de no atingir directamente el área reactiva, evitando, con eso, perjudicar el sustrato. Colocar las laminas en una jarra de Coplin o similar y lavar 3 veces con PBS, 5 minutos cada vez, agitando suavemente el Coplin algunas veces durante cada aclaración. Pingar 2 a 3 gotas de azul de Evans (5) en el Coplin de este última aclaración.

12. Remover las laminas del Coplin, una de cada vez. Quitar el exceso de PBS sacudiendo las sobre papel absorbente. Secar en torno del área reactiva y pasar inmediatamente para la etapa 13 para no secar el local de la reacción.

13. Pingar 3 a 4 gotas de glicerina taponada (4) entre el área reactiva. Cubrir las laminas con laminuelas evitando la formación de burbujas. Secar el exceso de glicerina con papel absorbente. Limpiar el dorso de la lamina.

14. Leer en microscopio de fluorescencia. Es conveniente hacer la lectura en el mismo día. Pero, en el caso de no ser posible, conservarlas en nevera (2-8°C), protegidas de la luz y leerlas en el día siguiente. La glicerina no debe secar. Si esto ocurrir colocar mas glicerina.

RESULTADOS DAS LECTURAS

Reacción Negativa: Ausencia de fluorescencia amarillo verdoso en todo el contorno del *Trypanosoma cruzi*. Los parásitos exhiben una coloración rojiza.

Reacción Positiva: Presencia de fluorescencia amarillo verdoso característica en todo el contorno del *Trypanosoma cruzi*.

Observación: Examinar siempre los controles positivo y negativo para control de la reacción.

INTERPRETACION

Sueros que dan reacción negativa son informados como NO Reactivos y significan individuos no parasitados. Sueros que dan reacción positiva son informados como reactivos y significan individuos parasitados por el *Trypanosoma cruzi*.

Nota: para una mayor seguridad en la pesquisa de anticuerpos anti-*T.cruzi*, se recomienda asociaciones de mas de un tipo de teste, buscando una mayor sensibilidad y posibilidad de confronto de resultados. La Wama Diagnóstica produce o Kit Imuno-HAI Chagas por hemaglutinación indirecta y el Imuno-ELISA Chagas por enzaima inmunoenzayo.

DESEMPEÑO DEL TESTE

El Imuno-Con Chagas de la Wama Diagnóstica presenta una sensibilidad de 100% utilizándose 158 muestras verdaderamente positivas. En 261 muestras verdaderamente negativas, no fueron encontrados resultados falso-positivo. Apenas en 5 muestras se observo fluorescencia inespecifica, confirniendo al Imuno Con Chagas de la Wama Diagnóstica una especificidad de 100%.

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

1. Reactivos solamente para uso diagnóstico in vitro.

2. El kit debe ser conservado en nevera entre 2-8°C.

3. La conservación de las laminas pueden ser hecha sellando las bordas con laminuela con esmalte de uña y guardando las en el oscuro entre 2-8°C por un mínimo 2 meses.

4. Como se emplea azida sódica a 0,095% como conservante, el descarte de reactivos deben ser acompañado de grandes volúmenes de agua para evitar acumulo de residuos de azida en los tuberías pues esta puede reaccionar plomo chumbo o cobre formando sales altamente explosivos. Además la azida tóxica, cuando ingerida.

5. Todos los materiales humanos usados en la preparación de los controles fueron testados, con resultados negativos para anticuerpos anti-HIV, anti-HIV y antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), pero como ninguno un diagnóstico ofrece completa seguridad de la ausencia de esos y de agentes infecciosos, recomendase tratar os sueros controles como material potencialmente infecciosos. 6. No sustituir componentes de esos kit con otros fabricantes ni usar componentes de lotes y códigos distintos.

7. No usar fuera de la fecha de caducidad

8. Descarte de lo material de acuerdo con las regulaciones locales.

9. Realizar un mantenimiento regular del microscopio, ya que la extracción de la vida de la lámpara podrían afectar el análisis de los resultados.

10. Seguir las buenas practicas de laboratorio (BPL) en la conservación, mantenimiento y descarte de los materiales











TERMINOS DE GARANTIA

La WAMA Diagnostica garantiza el cambio de este conjunto diagnostico si el momento que el mismo este dentro el plazo de caducidad y sea comprado por su accesoría técnica de que no hubieron fallos en la ejecución, mano conservación de este producto. La WAMA y sus distribuidores no se responsabilizan por los fallos en el desempeño del kit bajo sobre condiciones.

BIBLIOGRAFIA/BIBLIOGRAPHY/BIBLIOGRAFIA

- Camargo, M. E.: Preparation of microscopical slides to simplify immunofluorescent serological titrations. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, 7: 39-40, 1965.
- Camargo, M. E.: Fluorescent antibody test for serodiagnoses of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture for *Trypanosoma cruzi* in a slide test. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, 8(5): 227-234, (eds.). **Diagnóstico Laboratorial das Principais Infecções e Imunes.** Guanabara Koogan: 144-149, 1996.
- Dias, J. C. P.: Doenças de Chagas. In: Cimerman, B. e Cimerman, S.: **Parasitologia Humana e Seus Fundamentos Gerais.** Atheneu: 81-111, 1999.
- Ferreira, A. W. e Avila, S. L. M.: Doença de Chagas. In: Ferreira, A. W. e Avila, S. L. M. (eds.). **Diagnóstico Laboratorial das Principais Infecções e Imunes.** Guanabara Koogan: 144-149, 1996.
- Fife, E. H.; Muschel, L. H.: Fluorescent-antibody technique for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 101: 540, 1959.
- Levy, A. M. A.: Padronização e avaliação do teste de imunofluorescência triptomastigots fixados in situ na detecção de anticorpos indicadores da persistência da infecção em chagásicos crônicos. **Tese de Mestrado Universidade de São Paulo**, 1991.
- Luquetti, O. A. e Castro, A. M.: Diagnóstico sorológico da doença de Chagas. In: C. P. e Coura, J. R. (eds). **Clinica e Terapêutica da Doença de Chagas. Um Manual para o Clínico Geral. Rio de Janeiro: FioCruz:** 99-114, 1997.
- Oddo, D. et al.: Acute Chagas disease (trypanosomiasis americana) in acquired immunodeficiency syndrome. **Hum. Pathol.** 23: 41-44, 1992.

SIMBOLOGIA / SIMBOLS / SIMBOLOGIA

	O conteúdo é suficiente para (n) testes Quantily sufficient for (n) tests O contenido es suficiente para (n) testes		Número do lote Lot Number Número del lote
	Data limite de utilização Expiry Date Fecha de la caducidad		Número do catálogo Catalog Number Número del catálogo
	Produto diagnóstico <i>in vitro</i> In vitro diagnostic Producto diagnóstico <i>in vitro</i>		Limite de temperatura Temperature Limite de temperatura
	Consultar instruções para uso Refer to user's instructions Consultar las instrucciones para el uso		Proteger do calor Keep away from sun! Proteger del calor
	Representante Europeu European Representative Representante Europeu		Fabricado por Manufactured by Fabricado por