

Imuno-HAI CHAGAS

Kit para determinação qualitativa e semi-quantitativa de anticorpos anti-Trypanosoma cruzi no soro humano por hemaglutinação indireta.

An indirect hemagglutination kit for the qualitative and semi-quantitative detection of anti-Trypanosoma cruzi antibodies in human serum.

Kit para a determinación cualitativa y semi-cuantitativa de anticuerpos anti-Trypanosoma cruzi en el suero humano por hemaglutinación indirecta.

REF 34096-H: 96 determinações / determinations / determinaciones

REF 34192-H: 192 determinações / determinations / determinaciones

REF 34380-H: 380 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.wamadiagnostics.com.br

Obelis S.A.
Boulevard Général Wahis 53
1030 Brussels, BELGIUM
Phone. +(32) 2 732-59 54
Fax : +(32) 2 732-60 03
www.obelis.net

CE

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, hipertrofia e dilatação de certos órgãos, tais como esfôago 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 maioria dos indivíduos com sorologia positiva para *T. cruzi* desenvolve evidências clínicas da doença crônica, as informações prestadas pelo laboratório clínico tornam-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 (HAI), as reações de imunofluorescência indireta (IFI) e os imunoenzimáticos (ELISA).

PRINCÍPIO DO MÉTODO

Eritrócitos de aves estabilizados, sensibilizados com componentes antigênicos do *Trypanosoma cruzi* altamente purificados, mostram aglutinação quando reagem com anticorpos contra esses antígenos presentes no soro do paciente.

APRESENTAÇÃO DO KIT

REF 34096-H (96 determinações qualitativas)

1. Suspensão de hemácias sensibilizadas com componentes do *Trypanosoma cruzi* (1 x 4,8ml)
2. Solução diluente (1 x 40ml)
3. 2-Mercaptoetanol (0,5ml)
4. Soro controle positivo (1ml)

5. Soro controle negativo (1ml)
 6. Placa de microtitulação descartável com fundo em "V" (1 x 96 cavidades)
 7. Instruções para uso
- REF 34192-H (192 determinações qualitativas)**
1. Suspensão de hemácias sensibilizadas com componentes do *Trypanosoma cruzi* (1 x 4,8ml)
 2. Solução diluente (1 x 60ml)
 3. 2-Mercaptoetanol (0,5ml)
 4. Soro controle positivo (1ml)
 5. Soro controle negativo (1ml)
 6. Placa de microtitulação descartável com fundo em "V" (2 x 96 cavidades)
 7. Instruções para uso

REF 34380-H (380 determinações qualitativas)

1. Suspensão de hemácias sensibilizadas com componentes do *Trypanosoma cruzi* (2 x 4,8ml)
2. Solução diluente (2 x 60ml)
3. 2-Mercaptoetanol (1ml)
4. Soro controle positivo (1ml)
5. Soro controle negativo (1ml)
6. Placa de microtitulação descartável com fundo em "V" (4 x 96 cavidades)
7. Instruções para uso

PREPARAÇÃO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

• **SUSPENSÃO DE HEMÁCIAS SENSIBILIZADAS (1):** pronta para uso. Estável até a data do vencimento se conservada entre 2-8°C. **Não congelar.** Homogeneizar bem antes do uso, sempre com movimentos circulares do frasco entre as mãos e por inversão do frasco, mas nunca por agitação, pois esta pode acarretar hemólise e/ou autoaglutinação. Antes de ser usada, deixar em temperatura ambiente.

• **SOLUÇÃO DILUENTE (2):** conservar entre 2-30°C. **No momento do uso,** acrescentar 700 µl de 2-mercaptoetanol (3) para cada 10ml da solução diluente. Esta solução diluente com 2-mercaptoetanol é usada para diluir as amostras do soro. O uso do 2-mercaptoetanol tem como objetivo a retirada de anticorpos interferentes.

• **2-Mercaptoetanol (3):** Estável até a data do vencimento. Conservar ao abrigo da luz entre 2 - 8°C.

• **SORO CONTROLE POSITIVO (4):** pronto para uso. Estável até a data do vencimento se conservado entre 2-8°C

• **SORO CONTROLE NEGATIVO (5):** pronto para uso. Estável até a data do vencimento se conservado entre 2-8°C

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 mantido na temperatura indicada (2-8°C).

AMOSTRAS

Usar soros de pacientes em jejum, frescos ou conservados a -20°C. Evitar o congelamento e descongelamento repetidos do soro. Os soros envelhecidos tendem a gelificar em contato com 2-mercaptoetanol, provocando resultados falso-positivos. Recomenda-se o uso de soro inativado (não obrigatório).

MATERIAL NECESSÁRIO, MAS NÃO FORNECIDO

- Tubos de ensaio para diluição e titulação
- Pipetas sorológicas
- Vidrarias básicas de laboratório
- Recipiente para descarte de material contaminado.

PROCEDIMENTO

A. Teste qualitativo

1. Colocar a placa sobre um pano úmido para neutralizar as forças eletrostáticas.
2. Usar 1 cavidade de placa por amostra, incluindo sempre os controles positivo e negativo.
3. Utilizar diluição 1/32 da amostra com a solução diluente (2) com 2-mercaptoetanol (3). Recomenda-se diluir em um tubo de ensaio 10 µl da amostra + 0,31ml da solução diluente com 2-mercaptoetanol.

Obs. Não diluir soros controles positivo e negativo, pronto para uso, já diluído 1/32.

4. Pipetar 50 µl do soro controle positivo, negativo e da diluição 1/32 de cada amostra nas respectivas cavidades da placa. Sugere-se: A1 controle positivo, A2 controle negativo e A3, A4, A5... soros a serem testados.
5. Adicionar 25 µl da suspensão homogênea de hemácias (1) em cada cavidade.
6. Agitar a placa por vibração mecânica (agitador de placas) ou batendo, com os dedos, nas bordas da placa por 3 a 4 minutos.
7. Deixar em repouso por 1 a 2 horas em temperatura ambiente, em local livre de vibrações (IMPORTANTE).
8. Fazer leitura.

LEITURA

Reação Negativa: quando as hemácias se depositam no fundo da cavidade formando um botão.

Reação Positiva: quando as hemácias se depositam no fundo da cavidade como um tapete, as vezes com bordas irregulares.

B. Teste semi-quantitativo

Os soros que mostram reação positiva no teste qualitativo devem ser titulados.

1. Partir de uma diluição do soro de 1/32 conforme item 3 do teste qualitativo.
2. Pipetar 50 µl da solução diluente (2) com 2-mercaptoetanol (3), a partir da

segunda cavidade da placa, até a diluição que se pretende estudar. Ex.: se pretender diluir o soro até 1/512, pipetar 50 µl do diluente nas cavidades A2, A3, A4 e A5. Não pipetar na A1.

3. Transferir 50 µl da diluição do soro 1/32 para a primeira (A1) e segunda (A2) cavidades. Homogeneizar bem o soro com o diluente na segunda cavidade (diluição 1/64) e transferir 50 µl para a terceira cavidade (diluição 1/128) e assim sucessivamente, desprezando 50 µl no final.
4. Pipetar 25 µl da suspensão homogênea de hemácias (1) em todas as cavidades.

5. Agitar a placa por vibração mecânica (agitador de placas) ou batendo, com os dedos, nas bordas da placa por 3 a 4 minutos.

6. Deixar em repouso por 1 a 2 horas em temperatura ambiente, em local livre de vibrações (IMPORTANTE).

7. Fazer leitura.

INTERPRETAÇÃO

Títulos menores do que 1/32: NÃO REAGENTES.

Títulos iguais ou maiores que 1/32: REAGENTES.

TÍTULO DA AMOSTRA: Maior diluição que mostra uma reação positiva. O ponto final é quando o tapete de hemácias cobre 50% do fundo da cavidade.

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** produz o kit **Imuno-CO-N CHAGAS**, por imunofluorescência e o **Imuno-ELISA CHAGAS**, por enzimmimunoensaio.

DESEMPENHO DO TESTE

Sensibilidade clínica ou diagnóstica: 100% de sensibilidade - Em 83 amostras, do controle de qualidade, sabidamente positivas, foram comparadas e confirmadas com o Kit Hemacruz - BioMerieux. Todos os resultados foram satisfatórios, apresentando falso-negativos.

Especificidade: 98,7% de especificidade - Em 235 amostras, do controle de qualidade, sabidamente negativas foram comparadas e confirmadas com o Kit Hemacruz - BioMerieux. Todos os resultados foram satisfatórios, apresentando somente 4 amostras com resultados falso-positivo.

Precisão:

Intra-ensaio: Foram usadas 10 amostras em duplicata, realizado em 3 dias diferentes, para avaliação da precisão. Os valores negativos e positivos foram corretamente identificados em 100% das vezes.

Inter-ensaio: Usando as mesmas 10 amostras foram realizados 3 ensaios com três diferentes lotes sob as mesmas condições (data e operador). Os valores negativos e positivos foram corretamente identificados em 100% das vezes.

PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS

1. Não utilizar reagentes de lotes diferentes.
2. Ao deixar as placas em repouso, estas não devem sofrer vibrações, pois prejudica a qualidade da leitura.
3. O frasco de hemácias deve ser armazenado em posição vertical correta para evitar auto-aglutinação irreversível.
4. **USAR EXCLUSIVAMENTE A PLACA DO KIT**, que não deve ser reutilizada.
5. Pode ocorrer reação cruzada com Leishmaniose visceral e tegumentar.
6. Os títulos de anticorpos nas reações de hemaglutinação não costumam apresentar relação com a extensão das lesões ou gravidade clínica.
7. Todos os materiais humanos usados na preparação dos controles foram testados, com resultados negativos para anticorpos anti-HIV, antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) e anti-HCV, porém, como nenhum método diagnóstico oferece completa segurança da ausência destes e de outros agentes infecciosos, recomenda-se tratar os soros controles humanos como materiais potencialmente infecciosos.
8. Não congelar os reagentes.
9. Como se emprega azida sódica a 0,095% como conservante, além de tóxica quando ingerida, o descarte dos reagentes deve ser acompanhado de grandes volumes de água para evitar o acúmulo de resíduos de azida nos encanamentos, podendo formar sais altamente explosivos.
10. Descarte o material de acordo com as regulamentações locais.
11. Seguir as Boas Práticas Laboratoriais (BPL) 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, hepatosplenomegaly and parasitaemia.

Pseudo-cystus is formed after intracellular multiplication of parasite on muscles and on cells of the 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 esophagus 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* patients develop clinical evidence for chronic disease, the 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 (HAI), indirect immunofluorescence (IFI) and ELISA.

PRINCIPLE OF THE METHOD

Trypanosoma cruzi sensitised formalised tanned fowl erythrocytes. These erythrocytes reveal agglutination when react with antibodies against these antigens present in patients serum.

KIT PRESENTATION

REF 34096-H (96 qualitative tests)

1. *Trypanosoma cruzi* sensitised erythrocytes (1 x 2.4 ml)
2. Diluent solution (1 x 40ml)
3. 2-Mercaptoethanol (0,5ml)
4. Positive serum control (1ml)
5. Negative serum control (1ml)
6. Disposable "V"-well microtitration plate (1x96 wells)
7. Instructions for use

REF 34192-H (192 qualitative tests)

1. *Trypanosoma cruzi* sensitised erythrocytes (1 x 4.8 ml)
2. Diluent solution (1 x 60ml)
3. 2-Mercaptoethanol (0,5ml)
4. Positive control serum (1ml)
5. Negative control serum (1ml)
6. Disposable "V"-well microtitration plate (2 x 96 wells)
7. Instructions for use.

REF 34380-H (380 qualitative tests)

1. *Trypanosoma cruzi* sensitised erythrocytes (2 x 4.8 ml)
2. Diluent solution (2 x 60ml)
3. 2-Mercaptoethanol (1ml)
4. Positive control serum (1ml)
5. Negative control serum (1ml)
6. Disposable "V"-well microtitration plate (4 x 96 wells)
7. Instructions for use.

REAGENT STABILITY AND STORAGE

• **TRYPANOSOMA CRUZI SENSITISED ERYTHROCYTES (1):** Ready for use. Stable if stored at 2-8°C up to expiration date. **Do not freezer.** Homogenize before using, always in circular movements and for vial inversion but never agitate, since this movement can induce to haemolysis and/or agglutination. Allow the components reach to room temperature prior to use.

• **DILUTION SOLUTION (2):** Keep at 2-30°C. When ready to test, add 70 µl of 2-mercaptoethanol for 10ml of diluent solution. This mixing is intended to dilute the serum specimen . The use of 2-mercaptoethanol is intended to remove the antibodies which cause interference.

• **POSITIVE CONTROL SERUM (4):** Ready for use. Stable if stored at 2-8°C up to expiration date.

• **NEGATIVE CONTROL SERUM (5):** Ready for use. Stable if stored at 2-8°C 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 AND STORAGE

Fresh serum from fasting patients or stored at -20° should be used. Do not repeatedly freeze-thaw the serum. Old serum can freeze in contact with 2-mercaptoethanol, causing false positive results. Inactivated serum is recommended.

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Test tubes
- Serological pipettes
- Glasswire
- Disposable material container

PROCEDURE

A. Qualitative test

1. Lay the plate onto a humid piece of cloth to avoid electrostatics.
 2. Use 1 well of the plate for each specimen, including positive and negative controls.
 3. Dilute the serum at 1:32 together with diluent solution (2) and 2-mercaptoethanol (3). Suggestion: Dilute 10 µl of specimen + 0.31ml of diluent solution with 2-mercaptoethanol in a test tube.
- Obs.:** Positive and negative control serum are ready for use (pré-diluted at 1:32). They should not be diluted.
4. Pipette 50 µl of positive and negative controls and serum diluted at 1:32 of each sample on the respective wells. Suggestion: At 1 positive control, A2

negative control and A3, A4, A5...sera to be tested.
5. Add 25µl of erythrocytes homogeneous suspension (1) in each well.
6. Shake the plate by mechanical vibration (plate agitator) or beating with the fingers on the edges of the plate for 3 to 4 minutes.
7. Let rest for 1 to 2 hours at room temperature in a place free of vibration (IMPORTANT).
8. Read the results.

READING

NEGATIVE: Erythrocytes settle in the bottom of the well forming a button.
Positive: Erythrocytes settle in the bottom of the well, like a rug, often presenting irregular edges.

B. Semi-quantitative test

The serum which shows positive reaction in the qualitative test should be titered.

1. Dilute the serum at 1:32 according to step 3 of qualitative test.
2. Pipette 50µl of diluent solution with 2-mercaptoethanol (3) from the second well of the plate up to dilution that is intended to evaluate. Ex: If the dilution of the serum is up to 1:512, pipette 50µl of diluent in the wells A2, A3, A4 and A5. Do not pipette in the well 1.
3. Transfer 50µl of serum diluted at 1:32 in the wells A1 and A2. Homogenize the serum with the diluent in the well A2 (dilution 1:64) and transfer 50µl in the well A3 (dilution 1:128) and so on, discard 50µl in the end.
4. Pipette 25µl of erythrocytes homogeneous suspension (1) in all wells.
5. Shake the plate by mechanical vibration (plate agitator) or beating with the fingers on the edges of the plate for 3 to 4 minutes.
6. Let rest for 1 to 2 hours at room temperature in a place free of vibration. (IMPORTANT).
7. Read the results.

INTERPRETATION

Titers < 1:32: NEGATIVE

Titers = or > 1:32: POSITIVE

TITER OF THE SPECIMEN: The highest dilution showing positive reaction. The end point is when the erythrocytes cover 50% of the bottom of the well.

NOTE: It is advisable to use more than one kind of test in order to have a better sensitivity and results comparison when researching anti-*T.cruzi* antibodies. WAMA manufactures the kit **Imuno-CON CHAGAS**, immunofluorescence method and **Imuno-ELISA CHAGAS**, ELISA method.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Clinical and diagnostic sensitivity: 100% of sensitivity, 83 in-house positive specimens were compared with Hemacruzi kit - BioMerieux. All results were satisfactory. No false negative was found.

Specificity: 98.7 of specificity, 235 in-house negative specimens were compared with Hemacruzi kit - BioMerieux. All results were satisfactory. It was found only 4 false positive results.

Precision

Intra-assay: The precision was verified by using 10 specimens in duplicate and performance in 3 different days. The negative and positive values were identified at 100% of the times.

Inter-assay: The precision was verified by using the same 10 specimens and performance 3 assays with 3 different lots under the same conditions (date and operator). The negative and positive values were identified at 100% of the times.

PRECAUTIONS AND WARNINGS

1. Do not use reagents from different lots.
2. The plates should be free of vibration since it can affect the interpretation of results
3. The vials of the erythrocytes should be let stand to avoid irreversible auto-agglutination.
4. USE EXCLUSIVELY THE PLATE OF THE KIT. It should not be reused.
5. Cross reaction with visceral and legumentar Leishmaniasis can be present
6. The titers of the antibodies on the hemagglutination reactions are not related to the lesions or clinical seriousness.
7. All human components have been tested for anti-HCV, anti-HIV and HBsAg and found negative. However, this does not assure the absence of these and other infectious diseases. All human components should be handled as potentially hazardous..
8. Do not freeze reagents.
9. Sodium azide 0.095% is used as preservative. It can react with lead and cooper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. Sodium azide is toxic if ingested.
10. Disposal in accordance with local regulation.
11. Follow the good laboratory practices (GLP) related to storage, handling and material disposal.

WARRANT

WAMA Diagnóstica replaces this kit since it is not beyond expiration date. The returned kit must be evaluated by Wama's technical support. The warranty will be invalid and kit will not be replace 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 protozoario, o *Trypanosoma cruzi*, y transmitida por un insecto, el triatomíneo. Inmunológicamente, 3 etapas pueden ser considerados: agudo, latente o indeterminado y crónico. En la fase aguda, verificase fiebre, miocardiopatía, linfadenopatía, hepatosplenomegalia e parasitemia. La multiplicación intracelular del los parásitos en los músculos lisos y estriados y células del sistema retículo endotelial acarrear 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, y hipertrofia y dilatación de ciertos órganos como el estomago, colon, constituyendo los mega.

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, as 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 y inmunoenzimático. De esos, los mas utilizados son las reacciones de hemaglutinación indirecta (HAI) y las reacciones de inmunofluorescencia indirecta (IFI). Y los inmuo enzimáticos (ELISA).

PRINCIPIO DEL MÉTODO

Eritrocitos de aves estabilizados, sensibilizados con componentes antigénicos del *Trypanosoma cruzi* altamente purificados, muestran aglutinación cuando reacciona con anticuerpos contra esos antígenos presentes en el suero del paciente.

PRESENTACIÓN DEL KIT

REF 34096-H (96 determinaciones cualitativas)

1. Suspensión de hematies sensibilizadas con componentes del *Trypanosoma cruzi* (1x2,4ml)
2. Solución diluyente (1x40ml)
3. 2-Mercaptoetanol (0,5ml)
4. Suero control positivo (1ml)
5. Suero control negativo (1ml)
6. Placa de micro titulación desechable con el fondo en "V" (1x96 cavidades).
7. Instrucciones para el uso

REF 34192-H (192 determinaciones cualitativas)

1. Suspensión de hematies sensibilizadas con componentes del *Trypanosoma cruzi* (1x4,8ml)
2. Solución diluyente (1x60ml)
3. 2-Mercaptoetanol (0,5ml)
4. Suero control positivo (1ml)
5. Suero control negativo (1ml)
6. Placa de micro titulación desechable con fondo en "V" (2x96 cavidades)
7. Instrucciones para el uso

REF 34380-H (380 determinaciones cualitativas)

1. Suspensión de hematies sensibilizadas con componentes del *Trypanosoma cruzi* (2x4,8ml)
2. Solución diluyente (2x60ml)
3. 2-Mercaptoetanol (1ml)
4. Suero control positivo (1ml)
5. Suero control negativo (1ml)
6. Placa de micro titulación desechable con fondo en "V" (4x96 cavidades)
7. Instrucciones para el uso

PREPARACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

-Suspensión de hematies sensibilizadas (1): lista para el uso. Estable hasta la fecha de caducidad si conservada entre 2-8°C. No congelar. Homogeneizar bien antes del uso, siempre con movimientos circulares del frasco entre las manos y por inversión del frasco, pero nunca por agitación, pues esta puede acarrear hemólise y/o auto aglutinación. Antes de ser usada, dejar en temperatura ambiente.

-Solución diluyente (2): conservar entre 2-30°C. En el momento del uso, acectar en 70ul de 2-mercaptoetanol (3) para cada 10ml de la solución diluyente. Esta solución diluyente con 2-mercaptoetanol es usada para diluir muestras del suero. El uso de 2-mercaptaetanol tiene como objetivo la retirada de anticuerpos interferentes.

- 2-Mercaptoetanol (3): Estable hasta la fecha de caducidad. Conservar al abrigo de la luz entre 2-8°C.

-Suero control positivo (4): listo para el uso. Estable hasta la fecha de caducidad conservado entre 2-8°C.

-Suero control negativo (5): listo el para uso. Estable hasta caducidad si conservado entre 2-8°C.

Obs.: El kit mantiene el mismo desempeño después de la primeira utilización y es estable hasta la fecha de vencimiento descrita en el rótulo, siempre que sea conservado a la temperatura indicada (2-8°C).

MUESTRA

Usar sueros de pacientes en ayune, frescos o conservados a -20°C. Evitar el congelamiento y descongelamiento repetidos de suero. Los sueros envejecidos tienden gelificar en contacto con 2-mercaptoetanol, provocando resultados falso-positivos. Recomendase o uso inactivado (no obligatorio).

MATERIAL NECESARIO, PERO NO FORNECIDO

- Tubos de ensayo
- Pipetas suerológicas
- Vidrieras para laboratorio
- Recipiente para el descarte del material

PROCEDIMIENTO

A. Teste cualitativo

1. Colocar la placa sobre un paño húmedo para neutralizar las fuerzas electrostáticas.

2. Usar 1 cavidad de placa por muestra, incluyendo siempre es control positivo y negativo.

3. Utilizar diluente 1/32 de la muestra como solución diluyente (2) con 2-mercaptoetanol (3). Recomendase diluir en un tubo de ensayo 10µl de la muestra+ 0,31ml de la solución diluyente con 2-mercaptoetanol.

Obs.: Los sueros controles positivos y negativos estan listos para el uso (pré-diluidos en 1:32). Ellos no deben ser diluidos.

4. Pipetar 50µl de suero control positivo, negativo y de la dilución 1/32 de cada muestra en las respectivas cavidades de la placa. Se sugiere: A1 control positivo, A2 control negativo y A3, A4, A5...sueros a ser testados.

5. Adicionar 25µl de la suspensión homogénea de hematies (1) en cada cavidad.

6. Agitar la placa por vibración mecánica (agitador de placas) o golpeando, con los dedos, en las bordas de la placa por 3 a 4 minutos.

7. Dejar en reposo por 1 a 2 horas en temperatura ambiente, en local libre de vibraciones (Importante).

8- Hacer lectura.

LECTURA

Reacción negativa: cuando las hematies se depositan en el fondo de la cavidad formando un botón.

Reacción positiva: cuando las hematies se depositan en el fundo de la cavidad como una alfombra, las veces con bordas irregulares.

B. Teste semi-cuantitativo

Los sueros que mostran reacciones positivas en el teste cualitativo deben ser titulados.

1.a partir de una dilución del suero de 1/32 conforme el ítem 3 del teste cualitativo.

2. Pipetar 50µl de la solución diluyente (2) con 2-mercaptoetanol (3), a partir de la segunda cavidad de la placa, hasta la dilución que se pretende estudiar, si pretende diluir el suero hasta 1/512, pipetar 50µl de los diluyente en las cavidades A2, A3, A4 e A5. No pipetar en la A1.

3- Transferir 50µl de la dilución del suero 1/32 para la primera (A1) y segunda (A2) cavidades. Homogeneizar bien el suero con el diluyente en la segunda cavidad (dilución 1/64) y transferir 50µl para la tercera cavidad (dilución 1/28) y así sucesivamente, despresando 50µl en el final.

4- Pipetar 25µl de la suspensión homogénea de las hematies (1) en todas las cavidades.

5- Agitar la placa por vibración mecánica (agitador de placas) o golpeando con los dedos, e las bordas de la placa por 3 a 4 minutos.

6- Dejar en reposo por 1 a 2 horas en temperatura ambiente, en local libre de vibraciones (Importante)

7- Hacer lectura.

INTERPRETACIÓN

Títulos menores de que 1/32: No reactivos

Títulos iguales o mayores que 1/32: Reactivos

Título de la muestra: Mayor dilución que muestra una reacción positiva. El punto final es cuando las alfombras de hematies cobren el 50% del fondo de la cavidad.

Nota: Para una mayor seguridad en la pesquisa de anticuerpos anti- *T. cruzi* se recomienda la asociación de mas de un tipo de teste, buscando una mayor sensibilidad y posibilidad de confronto de resultados. La **Wama** produce el **Kit Immuo CON Chagas**, por inmunofluorescencia y el **Inmuo-ELISA Chagas**, por enzimmunoensayo.

DESEMPEÑO DEL TEST

Sensibilidad: 100% de sensibilidad. En 83 pruebas del control de calidad, verdaderamente positivas, fueran testadas y comparadas con el kit Hemacruzi - BioMerieux. Todas las pruebas fueron identificadas correctamente, sin resultados falso negativo.

Especificidad: 98,7% de especificidad. En 235 pruebas del control de calidad, verdaderamente negativas fueron testadas y comparadas con el kit Hemacruzi - BioMerieux. Todas las pruebas fueron identificadas correctamente, pero fueron encontradas 4 pruebas con resultado falso positivo.

Precisión:

Intra-ensayo: Fueron utilizadas 10 pruebas em duplicata y realizado los testes em 3 días diferentes para la evacuación de la precisión. Los valores negativos y positivos fueron correctamente identificados em 100% de las veces.

Inter-ensayo: Utilizando las mismas pruebas, fueron realizados 3 ensayos

independientes com 3 lotes diferentes en las mismas condiciones (data y operado). Los valores negativos y positivos fueron correctamente identificados em 100% de las veces.

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

1. No utilizar reactivos de lotes diferentes.
2. Al dejar las placas en reposo, estas no deben sufrir vibraciones, pues perjudican la cualidad de la lectura.
3. El frasco de hematies deben ser almacenado en posición vertical correcta para evitar auto-aglutinación irreversible.
4. Usar exclusivamente la placa del Kit, que no debe ser reutilizada.
5. Puede ocurrir reacción cruzada con leishmaniosis visceral y tegumentar.
6. Los títulos de anticuerpos en reacciones de hemaglutinación no acostumbra presentar relación con la extensión de las lesiones o gravedad clínica.
7. Todos los materiales humanos usados en la preparación de los controles fueron testados , con resultados negativos para anticuerpos anti-HIV, antígeno de superficie de la hepatitis B (HbsAg) y anti-HCV, pero, como ningún método diagnóstico ofrece completa seguridad de la ausencia de eses y de otros agentes infecciosos, recomendase tratar los sueros controles humanos como materiales potencialmente infecciosos.
8. No congelar los reactivos.
9. Como se emplea azida sódica a 0,095% como conservante, además de tóxica cuando ingerida, el descarte de los reactivos deben ser acompañados de grandes volúmenes de agua para se evitar el acumulo de residuos de azida en las tuberías, podendo formar sales altamente explosivos.
10. Descarte de lo material de acuerdo con las regulaciones locales.
11. Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) en la conservación , manoseo y descarte de los materiales











TÉRMINO DE GARANTÍA

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

BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAPHY / BIBLIOGRAFIA

1. Bing, D.H.; Weyand, J.G.M.; Stavitsky, A.B.: Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. *Proc. Soc. Exp. Bio.*, 124: 1166-1170, 1967.
2. Boné, G. J.; Parent, G.; Stearic acid, an essential growth factor for *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Microbiol.*, 31: 261-266, 1993.
3. Boyden, S.V.: The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. *J. Exp. Med.*, 93: 107-120, 1951.
4. Camargo, M.E.; Hoshino, S.; Siqueira, G.R.V.: Hemagglutination with preserved, sensitized cells: a practical test for routine serologic diagnosis of American trypanosomiasis. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 15(2): 81-85, 1973.
5. Camargo, M.E. et al.: Hemagglutination test for Chagas' disease with chromium chloride, formalin-treated erythrocytes, sensitized with *Trypanosoma cruzi* extracts. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 13(1): 45-50, 1971.
6. Dias, J.C.P.: Doença de Chagas. In: Cimerman, B. e Cimerman, S.: **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. Atheneu: 81-111, 1999.
7. Ferreira, A.W. e Avila, S.L.M.: Doença de Chagas. In: Ferreira, A.W.; Avila, S.L.M. (eds). **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. Guanabara Koogan: 114-149, 1996.
8. Hoshino-Shimizu, S. et al.: A control chart method for evaluating hemagglutination reagent used in Chagas' disease diagnosis. **PAHO Bull.**, 20(2): 170-178, 1986.
9. Luquetti, O.A.; Castro, A.M.: Diagnóstico sorológico da doença de Chagas. In: Dias, J.C.P. e Coura, J.R. (eds). **Clínica terapêutica da doença de Chagas. Um manual para o clínico geral**. **Rio de Janeiro:** Fiocruz: 99-114, 1997.
10. 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 Quantity 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 Produto 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 sunlight Proteger del calor
	Representante Europeu European Representative Representante Europeo		Fabricado por Manufactured by Fabricado por