

Doença de Chagas

Triagem e diagnóstico sorológico
em unidades hemoterápicas
e laboratórios de saúde pública



Ministério da Saúde
Programa Nacional de DST e Aids
Coordenação da Política Nacional de Sangue e Hemoderivados



Introdução

A doença de Chagas, descrita em 1909, é uma parasitose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Esse parasita é transmitido ao homem por um inseto conhecido popularmente pelos nomes de barbeiro, chupão, procotó, e outros.

O sanitarista brasileiro Carlos Justiniano Chagas descreveu sozinho, fato inédito na história da medicina, o ciclo completo da doença. Ele identificou o parasita, o transmissor, o reservatório animal dos parasitas e as manifestações clínicas da doença que levou o seu nome. Chagas denominou o parasita de *T. cruzi*, em homenagem a Oswaldo Cruz.

Além da transmitida pelo barbeiro, a infecção pelo *T. cruzi* é transmitida também por via sangüínea.

A doença é freqüente na América Central e na América do Sul. No Brasil, a ocorrência dessa enfermidade, que acomete cerca de três milhões de brasileiros, é particularmente elevada em alguns estados como Minas Gerais, Goiás, Rio Grande do Sul, Bahia e Piauí.

Recentemente casos de doenças de Chagas têm sido descritos em outros países não endêmicos, como Espanha e Estados Unidos. Nesses países a transmissão está sendo realizada por transfusão sanguínea, transplante de órgãos ou transmissão vertical.

O primeiro teste utilizado para detecção da infecção pelo *T. cruzi* foi a reação de Fixação do Complemento, desenvolvida por Guerreiro e Machado, em 1913. Hoje, esse teste apresenta apenas valor histórico, em razão da existência de testes sorológicos mais simples e mais precisos.

A utilização rotineira dos testes sorológicos em unidades hemoterápicas tem contribuído, de forma decisiva, para redução do número de casos pós-transfusionais da infecção pelo *T. cruzi*.

Neste manual estão apresentados os testes recomendados, tanto em unidades hemoterápicas, para triagem sorológica de doadores de sangue, quanto em laboratórios de saúde pública, para diagnóstico sorológico da infecção pelo *T. cruzi*, atendendo a critérios técnicos, de controle de qualidade e de biossegurança.



A doença de Chagas e os métodos de diagnóstico

Qual o agente causador da doença de Chagas?

Como você já sabe, o *Trypanosoma cruzi* é o parasita causador da doença de Chagas. Esse parasita é transmitido aos mamíferos (homens e animais) por insetos hematófagos como o *Triatoma infestans*, popularmente chamado barbeiro.



Atenção

Inseto hematófago: inseto que se alimenta de sangue.

Em condições naturais, o barbeiro ingere formas sanguíneas do *T. cruzi* ao se alimentar em um hospedeiro infectado. Essas formas sanguíneas diferenciam-se e multiplicam-se no trato digestivo do inseto, dando origem aos tripomastigotas metacíclicos que são eliminados nas fezes do barbeiro. Como o inseto tem o hábito de defecar no momento da picada, as fezes contendo os parasitas infectam os seres humanos por meio de lesões na pele, pelo orifício da picada ou pelas mucosas. Na figura 1, você pode ver o barbeiro e uma forma sanguínea do *T. cruzi*.



Figura 1 – *Triatoma infestans* e forma sanguínea do *T. cruzi*.

Quais as principais formas de contaminação pelo *T. cruzi*?

O *T. cruzi* é transmitido por:

- transfusões com sangue contaminado;
- transplantes de órgãos e tecidos.
- de mãe para filho (transmissão vertical);
- infecção acidental em laboratório;
- via oral, pela ingestão de alimentos contaminados pelo *T. cruzi*.

Quais os testes utilizados para o diagnóstico laboratorial da infecção pelo *T. cruzi*?

Para o diagnóstico laboratorial da infecção pelo *T. cruzi* são utilizados os seguintes testes:

- parasitológicos diretos (exame a fresco do sangue, técnicas de concentração do parasita, etc.). Esses testes são indicados na fase aguda da doença, quando a parasitemia é elevada;
- sorológicos, são testes imunológicos que detectam, no soro, antígenos ou anticorpos em vários tipos de infecção. Esses testes são utilizados para detecção da infecção pelo *T. cruzi* na fase crônica da doença.
- Antígeno - Ag - é qualquer substância que o organismo identifica como estranha e que induz à produção de proteínas específicas



Atenção

Anticorpo - Ac - também chamado imunoglobulina (Ig), é uma proteína produzida pelo sistema imune em resposta a um determinado antígeno. O anticorpo se liga de maneira específica ao antígeno.

A ligação específica entre o antígeno e o anticorpo constitui a base dos testes sorológicos.

No caso da doença de Chagas, esses testes baseiam-se na identificação de anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgG, predominantes na fase crônica da doença.

Há laboratórios que, além dos testes sorológicos, utilizam, na fase crônica, reações de amplificação dos ácidos nucleicos do parasita.



Atenção

Amplificação de ácido nucleico - seqüência de reações que promove o aumento de cópias de uma molécula de DNA ou RNA.

Essas reações são utilizadas em laboratórios de pesquisa, mas ainda não estão disponíveis para a rede de laboratórios. Por isso, a partir daqui, serão enfocados os testes sorológicos que são rotineiramente empregados na detecção da infecção pelo *T. cruzi*.

Quais os testes sorológicos mais utilizados para a detecção da infecção pelo *T. cruzi*?

Devido à sua elevada sensibilidade e especificidade, os testes sorológicos mais utilizados para a detecção da infecção pelo *T. cruzi* são:

1. Hemaglutinação Indireta (HAI);
2. Imunofluorescência Indireta (IFI);
3. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

A sensibilidade de um teste é a sua capacidade de dar um resultado positivo quando o indivíduo está verdadeiramente infectado.

A especificidade de um teste é a sua capacidade de dar um resultado negativo quando o indivíduo não está infectado.

Outros testes sorológicos são comercializados no Brasil, como por exemplo testes rápidos e western blot.



Como diagnosticar a infecção pelo *T. cruzi*

Quais os testes utilizados para o diagnóstico laboratorial da infecção pelo *T. cruzi*?

Para o diagnóstico laboratorial da infecção pelo *T. cruzi* são utilizados os seguintes testes:

- parasitológicos diretos (exame a fresco do sangue, técnicas de concentração do parasita, etc.). Esses testes são indicados na fase aguda da doença, quando a parasitemia é elevada;
- sorológicos, são testes imunológicos que detectam, no soro, antígenos ou anticorpos em vários tipos de infecção. Esses testes são utilizados para detecção da infecção pelo *T. cruzi* na fase crônica da doença.
- Antígeno-Ag - é qualquer substância que o organismo identifica como estranha e que induz à produção de proteínas específicas (anticorpos) pelo sistema imune.



Lembre-se

Anticorpo - Ac - também chamado imunoglobulina (Ig), é uma proteína produzida pelo sistema imune em resposta a um determinado antígeno. O anticorpo se liga de maneira específica ao antígeno.

A ligação específica entre o antígeno e o anticorpo constitui a base dos testes sorológicos.

No caso da doença de Chagas, esses testes baseiam-se na identificação de anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgG, predominantes na fase crônica da doença.

Há laboratórios que, além dos testes sorológicos, utilizam, na fase crônica, reações de amplificação dos ácidos nucleicos do parasita.

Amplificação de ácido nucleico - seqüência de reações que promove o aumento de cópias de uma molécula de DNA ou RNA.

Essas reações são utilizadas em laboratórios de pesquisa, mas ainda não estão disponíveis para a rede de laboratórios. Por isso, a partir daqui, serão enfocados os testes sorológicos que são rotineiramente empregados na detecção da infecção pelo *T. cruzi*.

Quais os testes sorológicos mais utilizados para a detecção da infecção pelo *T. cruzi*?

Devido à sua elevada sensibilidade e especificidade, os testes sorológicos mais utilizados para a detecção da infecção pelo *T. cruzi* são:

1. Hemaglutinação Indireta (HAI);
2. Imunofluorescência Indireta (IFI);
3. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).



Lembre-se

A sensibilidade de um teste é a sua capacidade de dar um resultado positivo quando o indivíduo está verdadeiramente infectado. A especificidade de um teste é a sua capacidade de dar um resultado negativo quando o indivíduo não está infectado.

Outros testes sorológicos são comercializados no Brasil, como por exemplo testes rápidos e western blot.



Diagnóstico em Laboratórios de saúde pública

Como registrar a entrada das amostras em laboratórios de saúde pública?

O registro pode ser feito por um sistema manual ou informatizado. De qualquer modo, é importante que você:

1. Verifique se a identificação no rótulo da amostra é a mesma da solicitação do(s) teste(s);
2. Copie da solicitação e registre numa planilha de resultados os seguintes itens básicos:
 - número de registro da amostra;
 - nome;
 - procedência da amostra (unidade que solicitou);
 - data da coleta;
 - sexo;
 - idade;



Lembre-se

Os dados devem sempre ser conferidos por duas pessoas. Erros de identificação podem levar à troca de resultados.

É preciso distribuir em alíquotas as amostras para análises nos laboratórios de saúde pública?

Nos laboratórios de saúde pública não existe a obrigatoriedade da alíquota para contraprova. No entanto, recomenda-se que a amostra seja distribuída, no mínimo, em duas alíquotas:

- Uma para realizar os testes solicitados;
- Outra para atender necessidades relacionadas, por exemplo, à execução de testes complementares.



Lembre-se

Para acondicionar e armazenar as amostras, utilize os mesmos procedimentos já apresentados para amostras de triagem sorológica.

Como é feito o diagnóstico sorológico da infecção pelo *T. cruzi* em laboratórios de saúde pública?

Veja, na Figura 1 o fluxograma para o diagnóstico sorológico da infecção pelo *T. cruzi* em laboratórios de saúde pública.

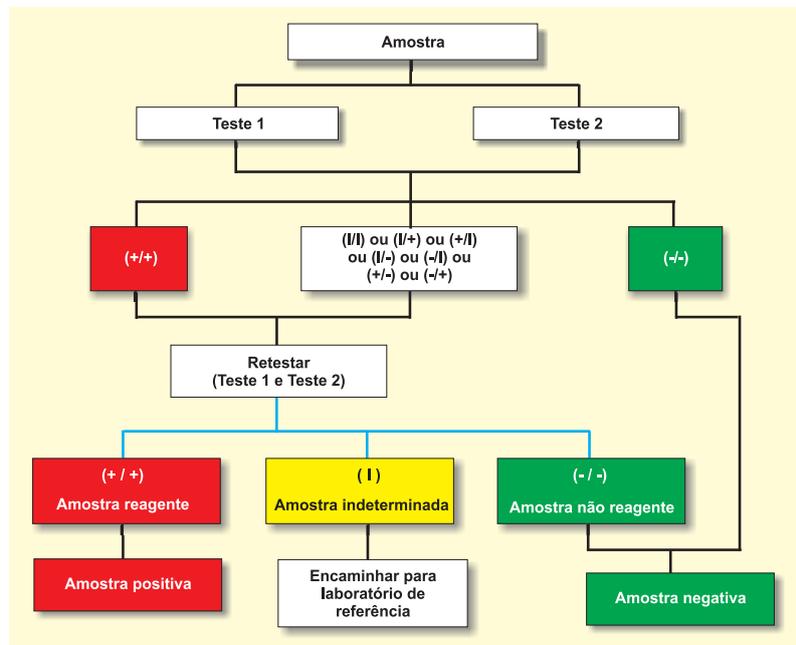


Figura 1 - Fluxograma para diagnóstico sorológico da infecção pelo *T. cruzi*

Para a compreensão do fluxograma do diagnóstico sorológico da infecção pelo *T. cruzi*, é importante observar que:

No teste 1 e 2:

- a amostra deve ser testada em dois testes (1 e 2) de princípios metodológicos diferentes, escolhidos de acordo com a disponibilidade do serviço: ELISA e HAI, ELISA e IFI ou HAI e IFI. Recomenda-se o ELISA como uma das escolhas, sempre que possível;
- a amostra não reagente nos dois testes tem o seu resultado definido como “amostra negativa” para a infecção pelo *T. cruzi*;
- a amostra reagente, indeterminada ou com resultados discordantes deve ser retestada pela repetição dos Testes 1 e 2, sendo que:
 - para o ELISA deve ser feita repetição em duplicata e com o mesmo conjunto diagnóstico;
 - para o HAI deve ser feita a titulação (teste quantitativo) com o mesmo conjunto diagnóstico utilizado na HAI qualitativa;
 - para o IFI deve ser feita a titulação (teste quantitativo) com os mesmos reagentes utilizados na IFI qualitativa.

Na retestagem:

- a amostra não reagente nos dois testes tem o seu resultado definido como “amostra negativa” para a infecção pelo *T. cruzi*;



Atenção

Em caso de amostras reagentes na testagem inicial (Teste 1 e Teste 2) e não reagentes na retestagem não libere nenhum dos resultados obtidos com as outras amostras testadas no mesmo protocolo. Isto porque é possível que tenha havido erro de transcrição no protocolo ou troca de amostras. Se o protocolo estiver correto, faça novamente o teste de todas as amostras seguindo o fluxograma.

- A amostra reagente nos dois testes tem seu resultado definido como “amostra positiva” para infecção pelo *T. cruzi*;
- A amostra indeterminada ou com resultados discordantes deve ser encaminhada a um laboratório de referência.



Infecção pelo *T. cruzi*

Triagem sorológica de doadores de sangue em unidades hemoterápicas

Que tipo de amostra deve ser utilizada?

O soro ou plasma são as amostras mais indicadas para detecção de anticorpos anti-*T. cruzi*.

As amostras não podem estar turvas, lipêmicas ou hemolisadas. Em qualquer desses casos elas devem ser descartadas e novas amostras devem ser solicitadas.



Atenção

A experiência de alguns pesquisadores tem demonstrado que quando se utiliza plasma nos testes sorológicos, ele deve ser centrifugado para separar e retirar fibrina.

A testagem do plasma contendo fibrina pode levar a resultados tanto falso-positivos quanto falso-negativos.

Como registrar a entrada das amostras para a triagem sorológica de doadores de sangue?

As informações contidas nos rótulos e etiquetas devem ser legíveis, impressas ou escritas à mão com tinta indelével, atóxica e à prova d'água.

É obrigatório o controle de rotulagem de cada unidade por duas pessoas diferentes. Deve, obrigatoriamente, ser utilizado a tecnologia de códigos de barras.

Os laboratórios de triagem sorológica devem trabalhar com tubos primários, colhidos diretamente do doador de sangue, até a fase de pipetagem da amostra nas placas ou tubos das estantes para realização das reações (RDC nº 153 /ANVISA/2004).

Em quantas alíquotas devem ser distribuídas as amostras, antes dos testes, para a triagem sorológica de doadores de sangue?

Antes da testagem, as amostras de soro ou plasma devem, obrigatoriamente, ser distribuídas em, no mínimo, duas alíquotas:

- Uma para os testes de rotina; e
- Outra para a contraprova.

Recomenda-se que a alíquota de contraprova tenha um volume de aproximadamente 1 mL.

A alíquota da contraprova deve ficar armazenada em temperatura igual ou inferior a -20°C durante pelo menos 6 meses após a doação.

A distribuição em um número maior de alíquotas e o volume das mesmas fica a critério de cada serviço.

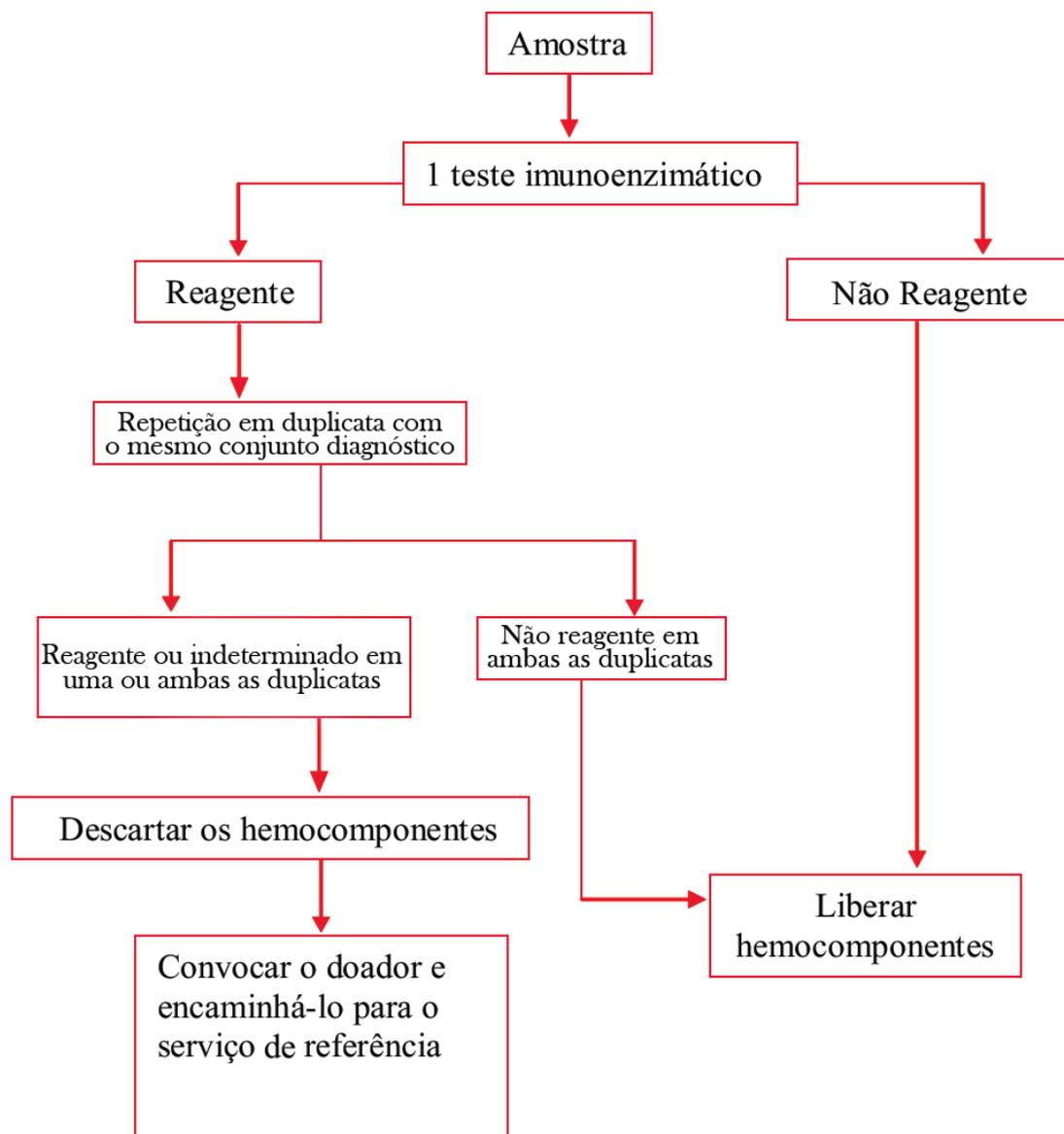
Como acondicionar e conservar as alíquotas, antes de fazer os testes para a triagem sorológica de doadores de sangue?

Caso a triagem sorológica não possa ser executada no momento do seu recebimento os tubos primários, os mesmos podem ser conservados em geladeira, entre 4 °C +/- 2 °C por 48 horas.

- Distribua em frascos próprios para congelamento a alíquota da contraprova e demais alíquotas a serem congeladas;
- Acondicione esses frascos em caixas de papelão ou plástico rígido, identificadas com informações que facilitem a localização dessas alíquotas.

Como é feita a triagem sorológica de doadores de sangue para doença de Chagas?

Veja o fluxograma recomendado para realização dessa triagem.



Atenção

Nas unidades hemoterápicas, a triagem sorológica de doadores de sangue é obrigatória e visa à proteção do receptor e não o diagnóstico da doença de Chagas.

Mais informações sobre triagem sorológica em unidades hemoterápicas, consulte a RDC nº153/ANVISA/2004).

Para compreensão deste fluxograma, é importante observar que:

O teste a ser utilizado deve ser imunoenzimático (ELISA) seguindo recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) no ano de 2000, que também recomenda o controle de qualidade externo para permitir que apenas os serviços de hemoterapia possam utilizar um teste único. Esta recomendação foi adotada pelo Ministério da Saúde, por meio da RESOLUÇÃO-RDC Nº 153, DE 14 DE JUNHO DE 2004.

Na Testagem:

- A amostra reagente tem seu resultado definitivo como “amostra reagente” para infecção pelo *T. cruzi*;
- A amostra não reagente tem seu resultado definido com a amostra “amostra não reagente” para infecção pelo *T. cruzi*;
- A amostra indeterminada com resultados na região cinza* é definida pelo fabricante;
- Amostras reagentes ou indeterminadas devem ser retestadas com o mesmo conjunto diagnóstico, agora em duplicata;

Na retestagem:

- A amostra reagente nas duas duplicatas tem seu resultado definido como “amostra reagente” para a infecção pelo *T. cruzi*;
- A amostra não reagente em ambas as duplicatas tem seu resultado definido como “amostra negativa” para a infecção pelo *T. cruzi*;
- A amostra indeterminada (duplicatas com resultados na região cinza) ou com resultados discordantes (uma duplicata positiva e outra negativa) é definida como “amostra indeterminada” para a infecção pelo *T. cruzi*;
- A definição do resultado de cada amostra, testada de acordo com este fluxograma, deve obedecer aos critérios apresentados no quadro a seguir:

Critérios para definição do resultado final da triagem sorológica de doadores de sangue para a doença de Chagas

Resultado do teste imunoenzimático	Resultados da Retestagem em Duplicata	Resultado da Triagem
(-)		negativa
(+)	(+) (+)	reagente
(±)	(-) (-)	negativa
	(+) (+)	reagente
	(±) (±)	indeterminada
	(±) (-)	
(±) (+)		
(-) (+)		

(-) não reagente

(+) reagente

(±) (região cinza)



Atenção

A liberação dos hemocomponentes só pode ser feita quando todos os testes sorológicos obrigatórios apresentarem resultados negativos, conforme normas vigentes do Ministério da Saúde.

Quais os procedimentos com os doadores que apresentarem resultados reagentes ou indeterminados?

Os doadores com resultados reagentes ou indeterminados para a infecção pelo *T. cruzi* devem ser encaminhados aos serviços de referência, para diagnóstico.

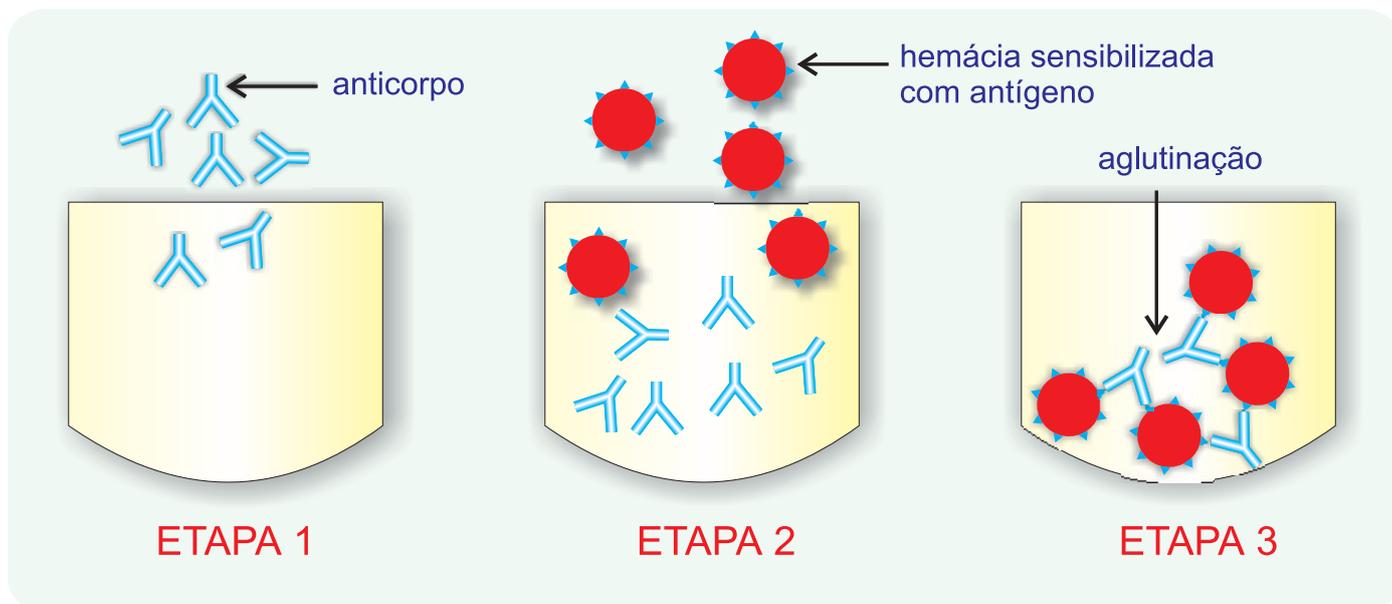
As unidades hemoterápicas devem notificar os casos reagentes para infecção pelo *T. cruzi* junto à vigilância epidemiológica local.



Teste de Hemaglutinação Indireta - HAI

Em que se baseia a reação de HAI?

A reação de HAI se baseia na aglutinação de hemácias sensibilizadas com antígeno *T. cruzi*, em presença de soro contendo anticorpos contra esse parasita. Veja na figura abaixo.



Representação esquemática de uma reação de hemaglutinação indireta (HAI).

Observe que:

- Na etapa 1, adiciona-se a amostra que, sendo reagente, contém anticorpos anti-*T. cruzi*. O suporte, em geral, é uma placa de microtitulação;



Atenção

Placa de microtitulação – produzida, geralmente, em poliestireno transparente com 96 cavidades ou em tiras (strips) de 8 ou 12 cavidades, com fundo em V ou em U.

- Na etapa 2, adiciona-se hemácias sensibilizadas com antígeno de *T. cruzi*;
- Na etapa 3, a reação antígeno é visualizada pela aglutinação das hemácias.

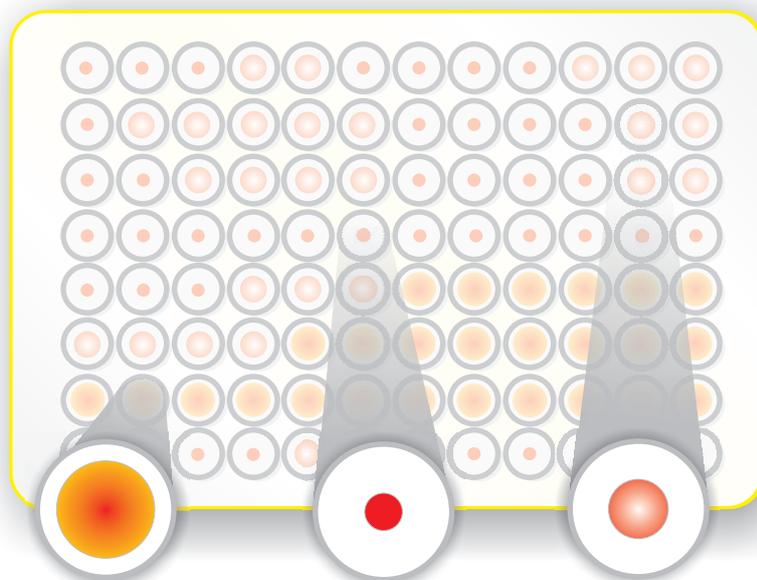
Como é feita a leitura da reação e quais os critérios para se considerar uma amostra reagente, não reagente ou indeterminada no teste de HAI?

A leitura é feita, a olho nu, com a placa de microtitulação colocada contra a luz ou em espelho próprio. Veja no Quadro 1, os critérios para a leitura.

Quadro 1 - Critérios para definir amostra reagente, não reagente ou indeterminada no teste de HAI

Amostra reagente	hemácias distribuídas de maneira homogênea, em forma de tapete ou manto, ocupando área maior do que 50% do fundo da placa.
Amostra não reagente	hemácias acumuladas em forma de botão no fundo do poço.
Amostra indeterminada	qualquer padrão diferente dos anteriores.

Confira esses critérios na figura abaixo:



Visualização de amostra reagente, não reagente e indeterminada na reação de HAI.



Atenção

O teste HAI pode ser qualitativo ou quantitativo.

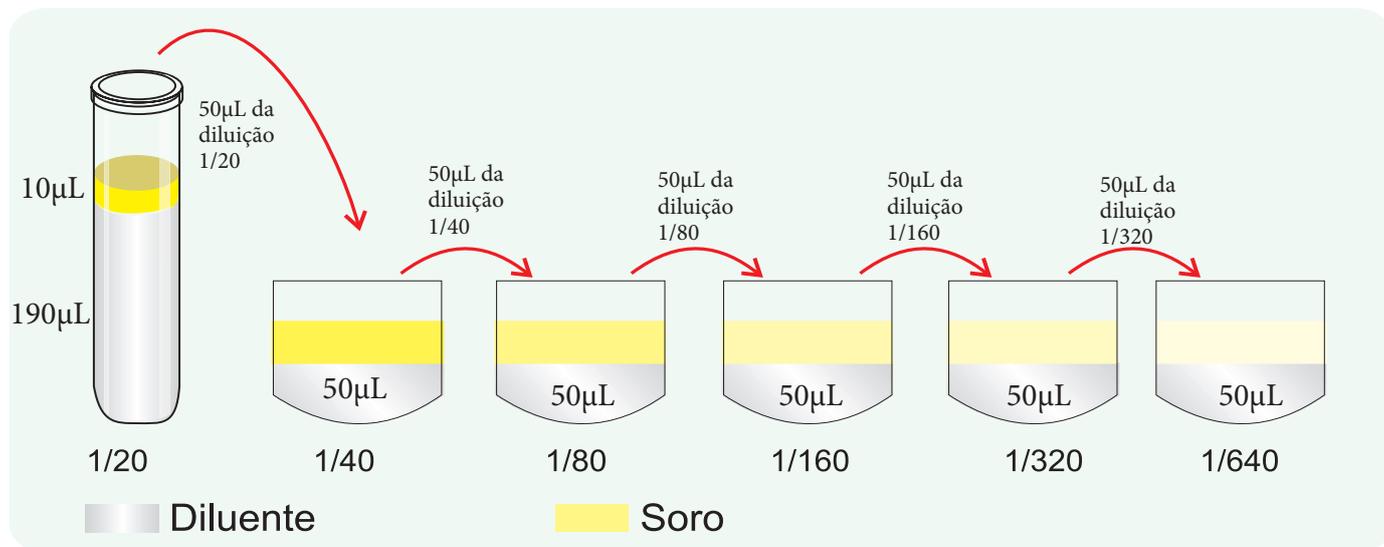
Quando se utiliza o teste de HAI qualitativo e o HAI quantitativo ou para titulação?

- O teste de HAI qualitativo é utilizado para definir se uma amostra é reagente ou não reagente. A amostra de soro para a realização de HAI qualitativa diluída uma única vez;
- O teste de HAI quantitativo, ou para titulação, é utilizado para confirmar os resultados das amostras reagentes ou indeterminadas no HAI qualitativo e para definir o título das amostras reagentes. Para a titulação é feita a diluição seriada das amostras do soro.

Como são feitas as diluições da amostra para o teste da HAI qualitativo e quantitativo?

O fabricante do conjunto diagnóstico fornece o diluente específico e define a diluição inicial da amostra para o teste qualitativo. As diluições da amostra para teste quantitativo são preparadas, em geral, na razão 2 a partir da diluição do teste qualitativo. Acompanhe um exemplo:

Uma amostra foi reagente no HAI qualitativo na diluição única de 1/20 de acordo com as orientações do fabricante. Para o teste HAI quantitativo foram feitas cinco diluições da amostra a partir da diluição 1/20 como apresentado na figura.

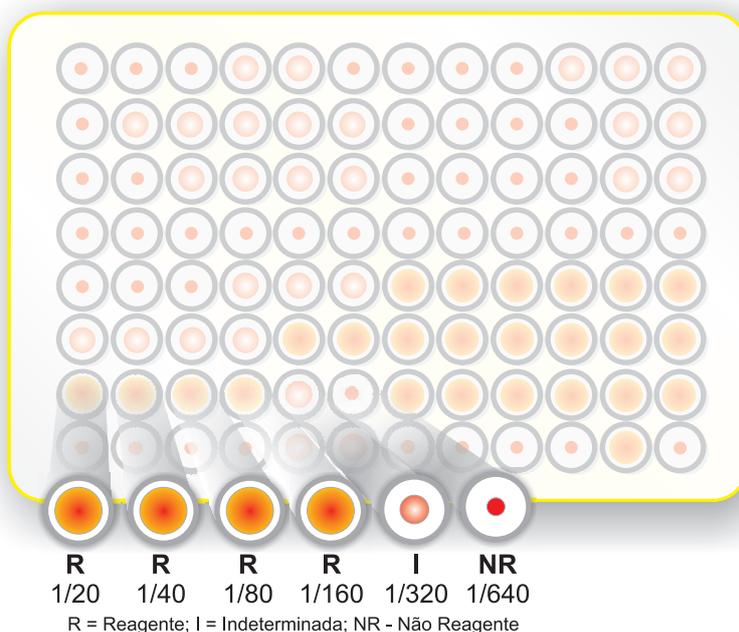


Atenção
É preciso homogeneizar cada diluição antes de fazer a seguinte.

Depois de diluir, é preciso determinar o título da amostra.

Como é determinado o título de uma amostra no teste de HAI?

Para determinar o título você testa cada uma das diluições da amostra em um poço da placa de microtitulação. O título corresponde à última diluição em que a amostra ainda foi reagente, desde que a diluição seguinte tenha um resultado negativo ou indeterminado. Continuando o exemplo do item interior, veja, na figura 5, o resultado obtido com cada uma das diluições da amostra:



Representação das reações de cada uma diluição da amostra no HAI

Observe que o título foi de 160, porque a diluição 1/160 foi a última onde a amostra ainda foi reagente.

Quais os materiais necessários para realizar o teste de HAI qualitativo ou quantitativo?

No quadro 2 estão os materiais geralmente fornecidos pelo fabricante e os materiais necessários mas não fornecidos.

Quadro 2 - Materiais utilizados para execução do teste de HAI

Materiais geralmente fornecidos pelo fabricante
placas de microtitulação com fundo em V ou em U
diluyente para os soros ou plasmas
soro-controle negativo
soro-controle positivo
hemácias sensibilizadas com antígeno <i>T. cruzi</i>
2 mercaptoetanol (2-ME)
Atenção: o 2-ME é recomendado por alguns fabricantes e incluído no conjunto diagnóstico. Essa substância quando misturada ao soro elimina a reatividade inespecífica diminuindo a possibilidade de se obter resultados falso-positivos e indeterminados.
Materiais não fornecidos pelo fabricante
pipetas manuais de volume ajustável (de 5 a 50 µl, de 50 a 200 µl e de 200 a 1.000 µl)
ponteiras descartáveis para as pipetas de volume ajustável
pipetas graduadas de 1ml, 5 ml e 10 ml e pêra de borracha
soro-controle positivo (CP) e negativo (CN) – produzido em seu próprio laboratório
fita adesiva transparente para selar a placa
espelho para leitura de placas de microtitulação (opcional)
agitador de placas (opcional)
protocolo de trabalho (vide bloco “Anexos”)
equipamentos de proteção individual: luvas, máscaras, avental ou jaleco
recipiente de paredes rígidas, boca larga e tampa contendo hipoclorito de sódio a 2%

Siga as orientações do fabricante para conservar e armazenar os reagentes.

Como realizar um teste de HAI qualitativo e quantitativo ou para titulação?

O teste de HAI, qualitativo ou quantitativo (titulação), deve ser realizado de acordo com as orientações do fabricante. No entanto, alguns procedimentos gerais devem ser observados:

1. Confira o conjunto diagnóstico (componentes, materiais, diluyente e reagentes), verificando se ele está sob condições adequadas de conservação e dentro do prazo de validade;



Atenção

Homogeneize as hemácias sensibilizadas com antígeno, verificando se estão sem grumos. Se você observar a presença de grumos, significa que houve autoglutinação das hemácias o que torna o antígeno impróprio para o uso.

2. Leia todas as instruções do conjunto diagnóstico antes de iniciar o teste;



Atenção

Separe uma ponteira descartável para cada amostra e para cada tipo de reagente a ser pipetado. Não reutilize ponteiras.

3. providencie os outros materiais, não fornecidos pelo fabricante, necessários para realização dos testes;
4. utilize exatamente os volumes indicados para o preparo de todas as soluções. Não faça qualquer alteração com o intuito de economizar reagentes;
5. deixe as amostras e os reagentes que serão utilizados atingirem a temperatura ambiente, antes de iniciar a reação;



Atenção

A temperatura ambiente em laboratório deve estar entre 20°C e 26°C

6. inclua soros-controles positivo e negativo fornecidos pelo fabricante e produzidos em seu laboratório;
7. faça um protocolo de trabalho, relacionando os controles, as amostras e as diluições correspondentes. Veja um exemplo de protocolo de HAI no Anexo 1 deste manual;
8. faça a diluição das amostras: a) para ao HAI qualitativo a amostra deve ser diluída em tubo, de acordo com a recomendação do fabricante, e depois pipetada na placa de microtitulação; b) para o HAI quantitativo a diluição seriada da amostra deve ser feita na razão 2, e a partir da diluição do HAI qualitativo. Faça cada uma das diluições diretamente em um poço da placa de microtitulação, de acordo com as instruções do fabricante;

Lembre-se: homogeneize o conteúdo de cada diluição da amostra antes de fazer a diluição seguinte. Utilize uma ponteira para cada diluição.



Atenção

Se o conjunto diagnóstico utilizar- 2-ME, antes das diluições, as amostras deverão ser preparadas do seguinte modo:

- * dilua o 2-ME 1/100 em salina. Por exemplo: 10 µL de 2-ME + 990 µL de solução 0,85% NaCl (cloreto de sódio isotônico, ou seja, "soro fisiológico");
 - * dilua cada amostra (soro puro) com 2-ME já diluído. Faça essa diluição em volumes iguais, por exemplo: para diluir 0,1 ml de soro utilize 0,1 ml de 2-ME já diluído;
 - * incube por 30 minutos a 37°C. É fundamental que o tempo de incubação seja exatamente 30 minutos.
9. Homogeneize suavemente o antígeno e pipete em cada poço da placa de microtitulação o volume indicado pelo fabricante;
 10. Cubra a placa com fita adesiva transparente de modo que fique totalmente vedada;
 11. Agite, suavemente, a placa de microtitulação, de preferência com o agitador de placa, para homogeneizar todos os componentes;
 12. Incube a placa à temperatura ambiente, em local sem vibrações, pelo tempo recomendado pelo fabricante;
 13. Faça a leitura da reação verificando se os resultados obtidos para os controles estão de acordo com os critérios definidos pelo fabricante. Se os resultados dos controles não estiverem de acordo, inicie novamente o teste. Só considere os resultados das amostras quando os resultados dos controles estiverem de acordo com os critérios;
 14. Registre os resultados no protocolo;
 15. Despreze as amostras e os resíduos do conjunto diagnóstico,

Jamais inicie a execução dos testes antes de arrumar sua bancada de trabalho com todos os materiais e equipamentos necessários.

- * Utilize sempre equipamentos de proteção individual e manipule as amostras como material potencialmente infectante.

Que medidas devem ser levadas em consideração para que você possa garantir a qualidade dos resultados do teste de HAI?

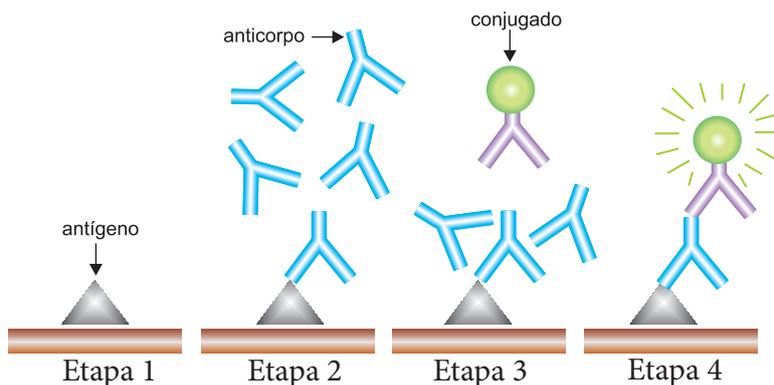
1. Leia atentamente todas as instruções do fabricante antes de iniciar qualquer reação;
2. Providencie todo o material necessário à execução do teste e que não está contido no conjunto diagnóstico;
3. não misture os controles, placas de microtitulação, hemácias sensibilizadas com antígeno e diluentes de diferentes lotes e/ou fabricantes;
4. homogeneize as hemácias observando se não houve aglutinação espontânea, antes de iniciar a reação; lembre-se: as hemáceas autoaglutinadas formam grumos que as tornam impróprias para o uso;
5. verifique se os reagentes apresentam turvação, precipitação ou alteração de cor, o que os torna impróprios para uso; não use reagentes com prazo de validade vencido;
6. execute as diluições da amostra em diluente específico fornecido no conjunto diagnóstico e de acordo com as orientações do fabricante; lembre-se que é fundamental homogeneizar cada diluição antes de fazer a seguinte e trocar a ponteira.
7. incube a placa de microtitulação em local sem vibrações.



Teste de imunofluorescência indireta - IFI

Em que se baseia a reação de imunofluorescência indireta (IFI)?

A reação de IFI baseia-se na interação do próprio *T. cruzi* (formas epimastigotas) com anticorpos contra esse parasita presente no soro. Veja na figura abaixo.



Representação esquemática da reação de IFI positiva

Observe que:

- na etapa 1, o próprio parasita *T. cruzi* é fixado numa lâmina de vidro com regiões demarcadas;
- na etapa 2, é adicionada a amostra diluída que, sendo reagente, contém anticorpos específicos que se ligam ao antígeno *T. cruzi*;
- na etapa 3, adiciona-se o conjugado composto de uma anti-imunoglobulina humana ligada ao isotiocianato de fluoresceína, que servirá como revelador da reação antígeno e anticorpo;
- na etapa 4, a interação antígeno/anticorpo é evidenciada por meio da fluorescência do parasita.

Assim como o HAI, o teste de IFI também pode ser qualitativo ou quantitativo:

- * IFI qualitativo: define se a amostra é reagente, não reagente ou indeterminada;
- * IFI quantitativo: confirma os resultados das amostras reagentes e indeterminadas no IFI qualitativo e define o título das amostras reagentes.

Como é feita a leitura da reação e quais os critérios para se considerar uma amostra reagente, não reagente ou indeterminada no teste de IFI?

Para leitura da reação, é necessário que você utilize microscópio de fluorescência. A interpretação dos resultados deve obedecer aos critérios descritos no quadro 3.

Interpretação de uma reação de IFI para diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi*

Amostra reagente	Presença de fluorescência uniforme em toda a membrana dos tripanossomas
Amostra não reagente	que se apresentam, geralmente, com coloração vermelho tijolo
Amostra indeterminada	Qualquer padrão diferente dos descritos anteriormente. Geralmente, os tripanossomas apresentam fluorescência inespecífica, ou seja, em várias partes

O teste de IFI pode ser quantitativo ou qualitativo.

Como são feitas as diluições da amostra para realizar o teste de IFI qualitativo e quantitativo?

As diluições da amostra são feitas com PBS (Phosphate-Buffered-Saline), ou seja, solução salina tamponada com fosfatos, também chamada tampão fosfato.



Atenção

Vejas orientações para preparar o PBS no bloco “fórmulas” deste manual.

Para o teste de IFI, as diluições são realizadas de acordo com as orientações definidas pela prática dos laboratórios de referência, ou seja:

- Para o teste de IFI qualitativo recomenda-se a diluição 1/20, na triagem sorológica de doadores em unidades hemoterápicas, enquanto que para diagnóstico nos laboratórios de saúde pública essa diluição deve ser de 1/40;
- Para o teste de IFI quantitativo recomenda-se a execução de pelo menos 5 diluições na razão 2 a partir da diluição do teste qualitativo.

Na figura 7, você pode conferir a seqüência de diluições da amostra para IFI quando for necessária a titulação na triagem sorológica de doadores de sangue.

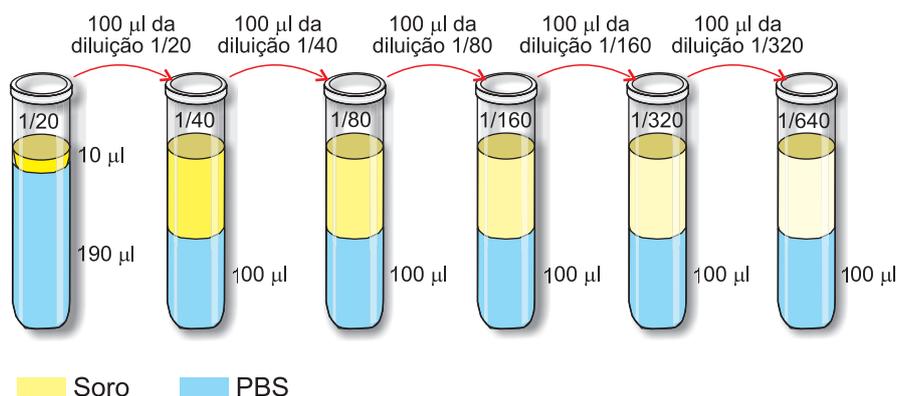


Figura 7 – Representação da seqüência de diluições da amostra no teste IFI quantitativo para triagem sorológica de doadores de sangue

Agora, veja na figura 8, a seqüência de diluições da amostra no IFI quantitativo para diagnóstico sorológico.

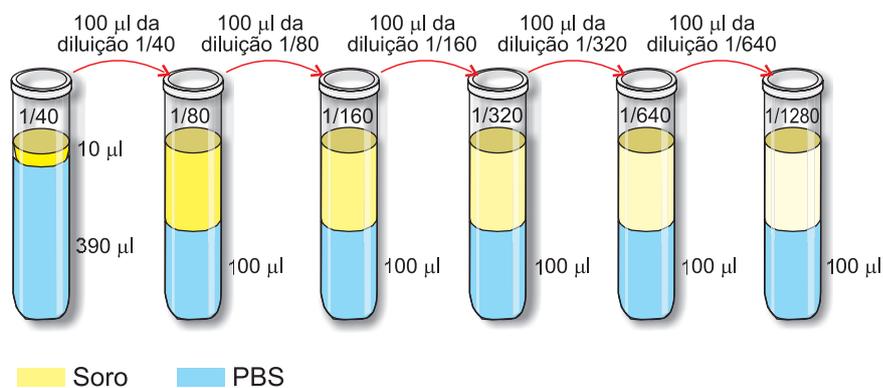


Figura 8 – Representação da seqüência de diluições na teste IFI quantitativo para diagnóstico sorológico.

A opção dos laboratórios de referência pela diluição inicial da amostra em 1/40 para diagnóstico sorológico foi feita após estudos epidemiológicos. Esses estudos demonstraram que soros de indivíduos verdadeiramente chagásicos apresentam reatividade em diluição igual ou maior que 1/40.

Os mesmos dados epidemiológicos indicaram que, na população não-chagásica, a presença de anticorpos naturais é responsável por um grande número de resultados falso-positivos, quando esses soros são testados em diluições menores do que 1/20.

Visando à proteção dos receptores de sangue e hemocomponentes, foi estabelecida a diluição inicial da amostra em 1/20, para evitar a ocorrência de resultados falso-negativos na triagem sorológica de doadores de sangue.

Como é determinado o título de uma amostra no teste de IFI?

Para determinar o título, cada uma das diluições da amostra é colocada em contato com antígeno, em uma demarcação da lâmina de IFI. O título, como você já sabe, corresponde à última diluição em que a amostra ainda foi reagente, desde que a diluição seguinte tenha um resultado negativo ou indeterminado.

Na reação de IFI o conjugado também precisa ser titulado.

Por que é necessário o titular o conjugado na reação de IFI?

O título de conjugado varia em função das condições de trabalho e do operador. Além disso, existem variações tanto na qualidade dos reagentes de cada lote quanto na capacidade de resolução dos diferentes microscópios de fluorescência. Portanto, mesmo que o fabricante indique o título, a titulação deve ser feita:

- a cada novo lote de conjugado ou de antígeno;
- sempre que o controle positivo acusar perda da intensidade de fluorescência.

Veja, no próximo item, quais os materiais necessários para titular o conjugado e testar as amostras por IFI.

Quais os materiais necessários para realizar o teste de IFI?

Para o teste de IFI, o antígeno e os reagentes são adquiridos separadamente ou juntos em um conjunto diagnóstico.

Quadro 4 - Materiais necessários para execução do teste de IFI

Reagentes
Antígeno de <i>T. cruzi</i> (fixado na lâmina, liofilizado ou em suspensão) Atenção: os antígenos liofilizados e em suspensão devem ser preparados e fixados nas lâminas seguindo rigorosamente as instruções do fabricante.
Tampão fosfato PBS (phosphate buffer saline) pH 7,2 – vide bloco “Fórmulas”
Azul de Evans (AE) (vide bloco “Fórmulas”)
Conjugado anti-imunoglobulina humana (total ou IgG) conjugada ao isotiocianato de fluoresceína
Glicerina tamponada pH (9,0 ± 0,5) – vide bloco “Fórmulas”
Soros-controle (positivo e negativo) – controle de qualidade interno da reação,
Equipamentos e materiais de laboratório
Relógio despertador (timer)
Lâminas demarcadas para IFI
Microscópio de fluorescência
Pipetas manuais de volume ajustável (5 µl a 50 µl, 50 µl a 200 µl, 200 µl a 1.000 µl)
Ponteiras descartáveis para as pipetas manuais
Balança semi-analítica e acessórios de pesagem
Agitador tipo Kline (opcional)
Estufa com temperatura regulável a 37°C
Câmara úmida

Cubas para lavagem de lâminas (cuba de Koplín)
Lâminulas 24 x 50 mm
Provetas de 1.000 ml
Béquer de 2.000 ml
Recipientes de paredes rígidas, boca larga e tampa contendo hipoclorito de sódio a 2%
Luvas descartáveis, óculos, máscaras ou protetor facial e jaleco
Protocolo de trabalho (vide bloco "Anexos")

Como armazenar os reagentes do teste de IFI?

As lâminas já contendo o antígeno fixado devem ser armazenadas a -20°C . Aqueles laboratórios que utilizarem antígeno liofilizado ou em suspensão devem ser conservados entre 2°C e 8°C , antes de fazer a fixação na lâmina.

A anti-imunoglobulina humana (total ou IgG), glicerina tamponada e azul de Evans, devem ser mantidos também entre 2°C e 8°C .

Agora que você já conhece os materiais e a forma de armazená-los, veja no próximo item como titular o conjugado.

Como realizar a titulação do conjugado?

A titulação do conjugado deve ser feita do seguinte modo:

1. leia atentamente todas as instruções do fabricante;
2. deixe o soro-controle negativo, o positivo e os demais reagentes atingirem a temperatura ambiente. Utilize um soro positivo com o título compreendido de 1/80 a 1/320;
3. deixe uma lâmina com antígeno já fixado atingir a temperatura ambiente;

Atenção

Evite atrito na parte superior da lâmina para não remover o antígeno fixado.

4. coloque a lâmina em estufa a 37°C até sua completa secagem. Cuidado: a lâmina não pode ficar na estufa além de 10 minutos, que é o tempo máximo necessário para sua secagem;
5. faça a identificação da lâmina e prepare um protocolo de trabalho, indicando as posições do soro controle positivo (CP), do negativo (CN) e do PBS. Veja na figura 9.

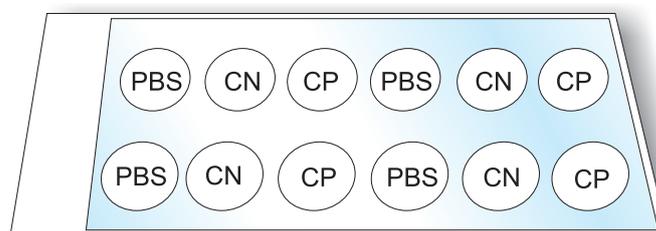


Figura 9 – Representação de uma lâmina para titulação do conjugado

Atenção

A demarcação contendo PBS é um controle para verificar se o conjugado reage inespecificamente com os parasitas. Se houver fluorescência no PBS, elimine a solução, prepare uma nova e repita o teste.

6. faça e homogeneize a diluição do soro CN a 1/20 (190 µl de PBS + 10 µl do CN);
7. faça a diluição do CP com PBS, de acordo com o título do soro que você estiver utilizando (1/80, 1/160 ou 1/320);
8. pipete nas derivações correspondentes da lâmina (figura 9) 10 µl do PBS, 10 µl do CN já diluído e 10 µl do CP já diluído;

Lembre-se: providencie uma ponteira descartável para cada tipo de controle e reagente a ser pipetado. Não reutilize as ponteiros.

9. coloque a lâmina em câmara úmida e incube em estufa a 37° C por 30 minutos;
10. faça a lavagem da lâmina, após incubação, do seguinte modo:
 - a) mergulhe-a, rapidamente, em um recipiente contendo PBS pH 7,2;
 - b) coloque a lâmina na cuba e adicione PBS pH 7,2 até cobri-la completamente;
 - c) coloque a cuba em agitação durante 5 minutos. Caso você não tenha um agitador tipo Kline, faça sucessivas e cuidadosas agitações manuais pelo mesmo espaço de tempo;
 - d) repita o passo b e c mais 2 vezes, trocando o PBS a cada vez;
 - e) lave rapidamente a lâmina em água destilada;
 - f) coloque-a em estufa a 37°C até a secagem completa

Lembre-se: a lâmina não pode ficar na estufa além de 10 minutos.

Enquanto aguarda a agitação e a secagem da lâmina, você pode executar os passos 11 e 12,

11. prepare a solução PBS e azul de Evans (AE) a 0,01%, para diluir o conjugado, seguindo as orientações do bloco "Fórmulas" deste manual.
12. faça as diluições do conjugado como apresentado na figura 10.

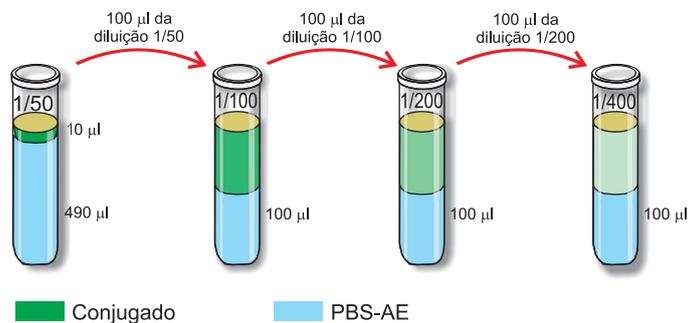


Figura 10- Diluições recomendadas para titular o conjugado



Atenção

É fundamental homogeneizar cada tubo antes de fazer a diluição seguinte e trocar a ponteira.

13. pipete 10 µl de cada diluição do conjugado nas demarcações correspondentes da lâmina. Confira na figura 11.

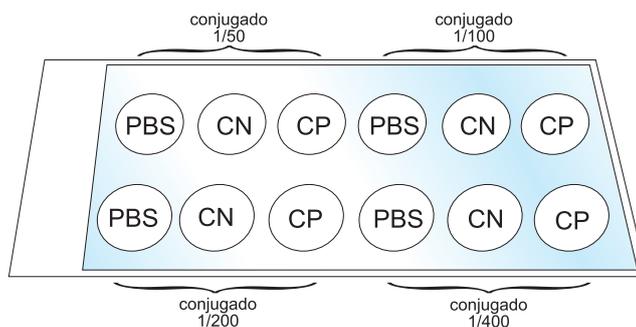


Figura 11 – Lâmina com PBS e soros positivo e negativo já diluídos para titulação do conjugado

14. Faça a incubação e a lavagem da lâmina seguindo os mesmos procedimentos descritos nos passos 9 e 10;
15. prepare a lâmina para leitura aplicando 2 a 3 gotas de glicerina tamponada pH 9,0 (± 0,5) sobre a mesma;
16. cubra a lâmina com uma lamínula 24 x 50 mm evitando a formação de bolhas. Mantenha a lâmina ao abrigo da luz e em local seco até a leitura;
17. faça a leitura da reação da lâmina em microscópio de fluorescência, utilizando objetiva de 40 vezes;
18. registre os resultados no protocolo.

Como interpretar os resultados para determinar o título ideal do conjugado?

Considera-se como título ideal do conjugado a maior diluição que apresentar:

- fluorescência uniforme em toda a membrana do parasita no soro controle positivo;
- ausência de fluorescência no controle negativo e no PBS.

Para compreender melhor, veja, no Quadro 5, os resultados obtidos, para cada diluição do conjugado.

Quadro 5 - Exemplo 1 - resultados obtidos na titulação do conjugado

Diluição do Conjugado	Resultados		
	CP	CN	PBS
1/50	Fluorescência uniforme em toda a membrana do parasita	Fluorescência descontínua na membrana do parasita	Ausência de fluorescência
1/100	Fluorescência uniforme em toda a membrana do parasita	Ausência de fluorescência	Ausência de fluorescência
1/200	Fluorescência inespecífica ou fraca em várias partes do parasita	Ausência de fluorescência	Ausência de fluorescência
1/400	Ausência de fluorescência	Ausência de fluorescência	Ausência de fluorescência

CP - Controle positivo CN - Controle negativo PBS - Salina tamponada

Como você pode ver, no exemplo, o título ideal do conjugado foi encontrado na diluição 1/100, que é a maior diluição onde foi observada fluorescência uniforme na membrana do parasita no controle positivo, sem fluorescência no controle negativo e no PBS.

Veja, agora, no Quadro 6, um outro exemplo.

Quadro 6 - Exemplo 2 - resultados obtidos na titulação do conjugado

Diluição do Conjugado	Resultados		
	CP	CN	PBS
1/50	Fluorescência uniforme em toda a membrana do parasita	Fluorescência descontínua na membrana do parasita	Ausência de fluorescência
1/100	Fluorescência uniforme em toda a membrana do parasita	Fluorescência descontínua na membrana do parasita	Ausência de fluorescência
1/200	Fluorescência uniforme em toda a membrana do parasita	Ausência de fluorescência	Ausência de fluorescência
1/400	Fluorescência uniforme em toda a membrana do parasita	Ausência de fluorescência	Ausência de fluorescência

CP - Controle positivo CN - Controle negativo PBS - Salina tamponada

Observe que, no exemplo 2, não foi encontrado o título ideal e, neste caso, você deve repetir os procedimentos de titulação com mais duas diluições do conjugado (1/800 e 1/1.600).



Atenção

É preciso repetir os procedimentos até que o título ideal do conjugado seja encontrado para que você possa testar as amostras.

Lembre-se que você deve titular o conjugado:

- a cada novo lote do conjugado ou do antígeno;
- sempre que o controle positivo acusar perda de intensidade de fluorescência.

Como realizar o teste de IFI qualitativo e quantitativo (titulação)?

1. Leia as instruções do fabricante de cada reagente antes de iniciar o teste;
2. Deixe os soros-controle e as amostras atingirem a temperatura ambiente. Inclua o controle de qualidade interno,
3. Deixe o conjugado, a glicerina tamponada e o azul de Evans atingirem a temperatura ambiente;
4. Faça o protocolo de trabalho. Você encontra um exemplo desse protocolo no Anexo 2 deste manual;
5. Retire do congelador o número de lâminas correspondentes à quantidade de amostras a serem testadas e deixe-as descongelar até atingirem a temperatura ambiente;



Atenção

As lâminas já devem estar com o antígeno fixado

6. Coloque essas lâminas em estufa a 37°C até a sua completa secagem (no máximo 10 minutos)

7. Faça em PBS a diluição das amostras;
- a) para o teste de IFI qualitativo;
 - faça a diluição a 1/20 nas unidades hemoterápicas;
 - faça a diluição a 1/40 nos laboratórios de saúde pública.
 - b) para o teste de IFI quantitativo (titulação), as diluições da amostra devem ser feitas na razão 2 a partir da diluição do IFI qualitativo, seguindo as orientações já apresentadas;

Lembre-se: homogeneize o conteúdo de cada diluição da amostra antes de fazer a diluição seguinte.

8. pipete, em cada demarcação da lâmina, 10 µL das diluições dos soros controles (CP e CN) e das amostras, de acordo com seu protocolo de trabalho;
9. coloque as lâminas em câmara úmida e incube-as em estufa a 37°C durante 30 minutos;
10. faça a lavagem das lâminas, após a incubação, seguindo os mesmos procedimentos descritos na titulação do conjugado;
11. dilua o conjugado de acordo com a titulação já realizada, enquanto aguarda o tempo de incubação das amostras. Calcule o volume do conjugado a ser diluído de acordo com o número de amostras a serem testadas. Em geral, 150 µL são suficientes para testar cada lâmina;
- Prepare somente o volume de PBS-AE a 0,01% necessário para diluir o conjugado.
 - Jamais utilize o conjugado diluído de um dia para outro.
12. pipete 10 µL do conjugado diluído em cada demarcação da lâmina;
13. faça a incubação e a lavagem das lâminas, seguindo os mesmos procedimentos já descritos nos passos 9 e 10;
14. prepare as lâminas para leitura, aplicando 2 a 3 gotas de glicerina tamponada pH 9,0 (± 0,5) sobre cada lâmina.
15. cubra cada lâmina com uma lamínula de 24 x 50 mm, evitando a formação de bolhas. Mantenha as lâminas ao abrigo de luz e em local seco até a leitura;
16. faça a leitura da reação em microscópio de fluorescência, utilizando objetiva de 40 vezes. Inicie a leitura pela demarcação que corresponde ao controle positivo; em seguida, leia a demarcação que corresponde ao controle negativo; e, finalmente, leia as demarcações correspondentes às amostras;



Atenção

Os controles devem apresentar padrão reagente (CP) e não reagente (CN). Caso contrário, descarte a lâmina e repita o teste a partir do primeiro passo, procurando identificar e corrigir as causas dos resultados inadequados. Só considere os resultados das amostras quando os resultados dos controles estiverem de acordo com os critérios do fabricante.

17. registre os resultados no protocolo;
18. despreze as amostras, a sobra do conjugado e os resíduos dos reagentes utilizados.

Jamais inicie a execução dos testes antes de arrumar sua bancada de trabalho com todos os materiais e equipamentos necessários.

Que medidas devem ser levadas em consideração para que você possa garantir a qualidade dos resultados do IFI?

1. leia atentamente todas as instruções do fabricante antes de iniciar qualquer reação;
2. providencie todo o material necessário à execução do teste;
3. homogeneize cada diluição antes de fazer a seguinte e troque a ponteira;
4. verifique se os reagentes apresentam turvação, precipitação ou alteração de cor, o que os torna impróprios para uso. Não use reagentes com prazo de validade vencido;
5. faça a titulação do conjugado a cada novo lote do conjugado e do antígeno e sempre que o controle positivo acusar perda de reatividade;
6. não utilize o conjugado diluído de um dia para o outro;
7. verifique as condições de funcionamento do microscópio.



Teste de Elisa

Em que se baseia o ELISA?

O ELISA é um teste imunoenzimático que se baseia na interação antígeno-anticorpo evidenciada pela ação de uma enzima e o substrato apropriado, e revelada por um cromógeno.

Cromógeno – substância que revela a ação de uma enzima sobre o substrato por meio de mudança de cor.

São componentes do ELISA: fase sólida, antígeno, enzima, substrato, cromógeno e solução de bloqueio da reação.

Fase sólida: material capaz de adsorver o antígeno ou o anticorpo que será empregado no teste.

Quais as variações encontradas nos componentes do ELISA para o diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi*?

Confira no quadro abaixo, as variações encontradas nos componentes do ELISA para diagnóstico da doença de Chagas.

Variações encontradas nos componentes do ELISA

Componentes	ELISA
Fase Sólida	<ul style="list-style-type: none">placas de microtitulação - produzidas, geralmente, em poliestireno transparente com 96 cavidades ou em tiras (<i>strips</i>) de 8 ou 12 cavidades, com fundo chato ou arredondadopérolas - pequenas esferas de poliestireno
Antígeno	<ul style="list-style-type: none">frações isoladas do parasita <i>T. cruzi</i>, preparadas para reduzir a possibilidade de reação cruzada
Enzima	<ul style="list-style-type: none">fosfatase alcalina ouperoxidase
Substrato	<ul style="list-style-type: none">peróxido de hidrogênio (H_2O_2)
Cromógenos	<ul style="list-style-type: none">ortofenilendiamina (OPD) outetrametil benzidina (TMB)
Solução de Bloqueio	<ul style="list-style-type: none">H_2SO_4 ouHCl

Qual o tipo de ELISA utilizado no diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi*?

Para a detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* utiliza-se o ELISA indireto.

Qual a seqüência de um ELISA indireto?

A figura 12 apresenta a seqüência de um ELISA indireto para uma amostra reigente:

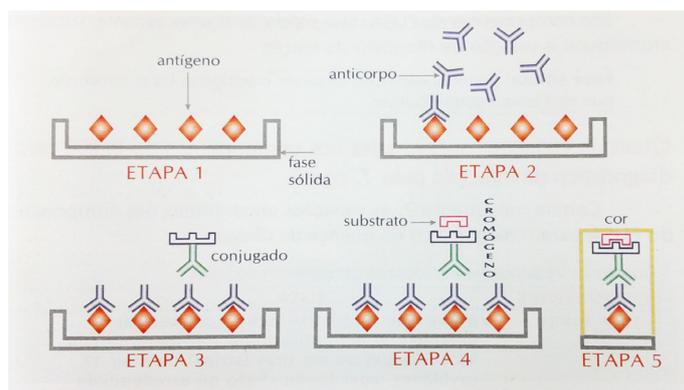


Figura 12 – Seqüência esquemática de um ELISA indireto para uma amostra reigente
Doença de Chagas - Triagem e diagnóstico sorológico em Unidades Hemoterápicas e Laboratórios de Saúde Pública

Observe que:

- Na etapa 1, os antígenos estão adsorvidos à fase sólida;
- Na etapa 2, é adicionada a amostra que, sendo reagente, contém anticorpos específicos que se ligam à fase sólida;
- Na etapa 3, com a adição de um conjugado, composto de uma enzima ligada a um anti-anticorpo (anti-imunoglobulina), ocorre a interação conjugado e anticorpo da amostra;
- Na etapa 4, adicionam-se o substrato e o cromógeno;
- Na etapa 5, a ação da enzima no substrato é revelada pelo cromógeno, que sofre um processo de oxidação dando origem a um produto com cor na amostra reagente. A cor varia de acordo com o tipo de cromógeno utilizado. Nessa etapa, é adicionada uma solução de bloqueio para interromper o processo de oxidação. Se esse processo não for interrompido, haverá aparecimento de cor em todas as amostras levando a resultados falso-positivos.



Atenção

Se não houver anticorpo específico na amostra, ou seja, se ela for não reagente, a reação não acontecerá e conseqüentemente não haverá desenvolvimento de cor.

A cor resultante da ação da enzima deve ser lida em espectrofotômetro.

Como definir se um resultado de ELISA é reagente, não reagente ou indeterminado?

No ELISA o resultado de uma reação é definido pela leitura da absorbância ou densidade ótica (DO) em espectrofotômetro, utilizando um filtro com comprimento de onda indicado pelo fabricante do conjunto diagnóstico. Usualmente, cada conjunto tem sua forma de calcular o ponto de corte (cut-off-CO), acima ou abaixo do qual as amostras são consideradas reagentes, não reagentes ou indeterminadas.

As amostras indeterminadas são aquelas cujos valores de DO estão incluídos na zona cinza (borderline). A zona cinza compreende a faixa de valores em torno do cut-off, dentro da qual não se pode ter certeza do resultado.

Como definir a zona cinza no ELISA?

Em geral, o fabricante do conjunto diagnóstico indica como definir a zona cinza.

Quando não existir a orientação do fabricante, recomenda-se que sejam consideradas indeterminadas as amostras com valores de DO incluídas no intervalo de 10% a 20%, abaixo ou acima do valor do cut-off.

Acompanhe um exemplo do cálculo do intervalo de 10% para definição da zona cinza:

ELISA com CO= 0,20

10% do CO = $0,20/10 = 0,02$

Limite inferior da zona cinza = $CO-10\% = 0,20 - 0,02 = 0,18$

Limite superior da zona cinza = $CO +10\% = 0,20 +0,02 = 0,22$

Quais os materiais utilizados para execução do ELISA?

No quadro abaixo estão os materiais geralmente fornecidos pelo fabricante e os materiais não fornecidos.

Materiais utilizados para execução do ELISA

Materiais geralmente fornecidos pelo fabricante
placa de microtitulação ou pérolas sensibilizadas com antígeno <i>T. cruzi</i>
selos ou tampas de cobertura
soro-controle negativo
soro-controle positivo
soluções-tampão para a diluição das amostras e do conjugado
solução-tampão para a lavagem
conjugado
substrato e cromógeno
solução-tampão para diluir o substrato
solução de bloqueio de reação
Materiais não fornecidos pelo fabricante
relógio (timer)
pipetas manuais de volume ajustável (de 5 a 50 μ l, de 50 a 200 μ l e de 200 a 1.000 μ l) mono e multicanal
ponteiras para pipetas manuais de volume ajustável
pipetas graduadas de 5 ml e 10 ml
pêra de borracha ou outro auxiliar de pipetagem
barquetes (reservatórios) para a utilização de pipetas multicanal
béquero de 1.000 ml
provetas de 100 ml, 500 ml e 1.000 ml
frasco com tampa de 1.000 ml
bastão de vidro
equipamentos de proteção individual: luvas, máscaras, avental ou jaleco
recipiente de paredes rígidas, boca larga e tampa contendo hipoclorito de sódio a 2%
protocolo de trabalho (vide bloco "Anexos")

Siga as orientações do fabricante, para conservar e armazenar os reagentes.

Além dos materiais constantes do Quadro 8, o laboratório deve estar equipado com banho-maria com termostato para regulagem de temperatura; estufa com termostato regulável; sistema de lavagem e de leitura compatíveis com os métodos empregados e com as especificações dos conjuntos diagnósticos disponíveis.



Atenção

Antes de iniciar um procedimento, verifique se os equipamentos estão em condições adequadas de uso.

Quais os procedimentos necessários para executar o ELISA?

Os procedimentos variam de acordo com o fabricante do conjunto diagnóstico. Alguns procedimentos gerais, no entanto, devem ser observados:

1. confira o conjunto diagnóstico, verificando todos os seus componentes, se eles estão sob condições adequadas de conservação e dentro do prazo de validade;
2. leia todas as instruções do conjunto diagnóstico antes de iniciar a reação;
3. providencie os outros materiais, não fornecidos pelo fabricante, necessários para a realização dos testes;



Atenção

providencie uma ponteira descartável para cada amostra e para cada tipo de reagente a ser pipetado. Não reutilize ponteiras.

4. utilize exatamente os volumes indicados para preparar as soluções, não faça qualquer alteração com o intuito de economizar reagentes;
5. deixe as amostras e os reagentes que serão utilizados atingirem a temperatura ambiente, antes de iniciar a reação;

A TEMPERATURA AMBIENTE EM LABORATÓRIOS DEVE ESTAR ENTRE 20°C E 26°C

6. Homogeneize as amostras;
7. inclua, além dos controles fornecidos pelo fabricante, o controle de qualidade interno da reação, conforme orientação dos cursos TELELAB – “Controle de Qualidade de Testes Sorológicos em Unidade Hemoterápicas e Laboratórios de Saúde Pública”
8. faça um protocolo de trabalho, relacionando os controles e as amostras. Veja o exemplo de um protocolo de ELISA no Anexo 3 deste manual;
9. siga rigorosamente os tempos de incubação e os ciclos de lavagem indicados pelo fabricante, tendo o cuidado de evitar a contaminação cruzada das amostras;
10. Faça a leitura da absorbância em espectrofotômetro, utilizando o filtro recomendado pelo fabricante;

SIGA AS ORIENTAÇÕES DO FABRICANTE DO CONJUNTO DIAGNÓSTICO
PARA O CÁLCULO DO CUT-OFF.

11. Verifique se os resultados obtidos para os controles estão de acordo com os critérios definidos pelo fabricante. Caso contrário, faça novamente o teste procurando identificar e corrigir as causas dos resultados inadequados. Só considere os resultados das amostras quando os resultados dos controles estiverem de acordo com os critérios do fabricante;
 12. registre os resultados no protocolo;
- despreze as amostras e os resíduos do conjunto diagnóstico utilizado e, recipiente apropriado para material infectante.

Jamais inicie a execução dos testes antes de arrumar sua bancada de trabalho com todos os materiais e equipamentos necessários.

Que medidas devem ser levadas em consideração para que você possa garantir a qualidade dos resultados do ELISA?

- Verifique se os reagentes apresentam turvação, precipitação ou alteração de cor, o que os torna impróprios para uso. Não use reagentes com prazo de validade vencido;
- Não misture controles, conjugados, pérolas ou placas de diferentes lotes e/ou fabricantes;
- Armazene os conjuntos diagnósticos de acordo com as recomendações do fabricante;
- Não exponha o substrato à luz durante o armazenamento ou incubação da reação, evitando assim a fotodecomposição do mesmo;
- Não coloque o substrato em contato com substâncias oxidantes ou metais, para evitar sua degradação, evidenciada pela alteração de cor;
- Faça limpeza e a manutenção periódica dos equipamentos de lavagem, evitando dessa maneira o acúmulo de sais e outros compostos químicos;
- Verifique se o filtro usado para a leitura da absorbância é aquele indicado pelo fabricante.



Anexo 1 - Exemplo de protocolo de Hai para Doença de Chagas

EXEMPLO DE PROTOCOLO DE HAI PARA DOENÇA DE CHAGAS

TESTE DE HEMAGLUTINAÇÃO INDIRETA (HAI)

Protocolo nº: _____ Data: _ / _ / _

Fabricante: _____ Lote: _____ Validade: _ / _ / _

Técnico responsável: _____

Identificação das amostras e resultados da leitura

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----

A	Identificação											
	Resultado											
B	Identificação											
	Resultado											
C	Identificação											
	Resultado											
D	Identificação											
	Resultado											
E	Identificação											
	Resultado											
F	Identificação											
	Resultado											
G	Identificação											
	Resultado											
H	Identificação											
	Resultado											

Observações: _____



Anexo 2 - Exemplo de protocolo de IFI para Doença de Chagas

PROTOCOLO DE TESTE DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI) PARA DOENÇA DE CHAGAS

IFI nº: _____ Data: __ / __ / __
Antígeno: _____ Lote: _____ Validade: __ / __ / __
Conjugado: _____ Lote: _____ Validade: __ / __ / __ Diluição: _____
Técnico responsável: _____

Resultados	Identificação
------------	---------------

Lâmina nº: _____

1	2	3	4	5	6
7	8	9	10	11	12

1. Controle Positivo	7. _____
2. Controle Negativo	8. _____
3. _____	9. _____
4. _____	10. _____
5. _____	11. _____
6. _____	12. _____

Lâmina nº: _____

1	2	3	4	5	6
7	8	9	10	11	12

1. Controle Positivo	7. _____
2. Controle Negativo	8. _____
3. _____	9. _____
4. _____	10. _____
5. _____	11. _____
6. _____	12. _____

Lâmina nº: _____

1	2	3	4	5	6
7	8	9	10	11	12

1. Controle Positivo	7. _____
2. Controle Negativo	8. _____
3. _____	9. _____
4. _____	10. _____
5. _____	11. _____
6. _____	12. _____

Observações: _____



Anexo 3 - Exemplo de protocolo de Elisa para Doença de Chagas

EXEMPLO DE PROTOCOLO DE ELISA PARA DOENÇA DE CHAGAS

Protocolo nº: _____

Data: _ / _ / _

Fabricante: _____ Lote: _____

Validade: _ / _ / _

Técnico responsável: _____

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Observações: Ponto de Corte ("*cut-off*"): _____



Referências Bibliográficas

Ferreira, A.W.; Ávila, S.L.M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. Editora Guanabara Koogan, 2ª Edição, 443 p., Rio de Janeiro, 2001.

Gomes, Y.M. PCR and sero-diagnosis of chronic Chagas' disease: biotechnological advances. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 66:107-119, 1997.

Henry J. B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. Barueri: Manole, 20ª edição, 2008.

Luquetti A.O, Castro A.M. Capítulo 6. **Diagnóstico sorológico da doença de Chagas**. In: *Clínica e Terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral*. Ed. JCP Dias, JRCoura. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro. p. 99-113, 1997. Disponível em: <http://books.scielo.org/id/nf9bn/pdf/dias-9788575412435.pdf>

Luquetti, A.O.; Rassi, A. **Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi***. In Brener, Z.; Andrade, Z.; Barral-Netto, M (org.), *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 344-348, 2000.

Luquetti A.O, Schmuñis G.A. **Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection**. Chapter 28 In: Telleria J, Tibayrenc M. American Trypanosomiasis Chagas Disease One Hundred Years of Research. Elsevier, Amsterdam (E-book). p. 743-792, 2010.

Ministério da Saúde. Consenso Brasileiro de Doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* V. 38, suplemento III, p. 1-29, 2005.

Vaz, A.J.; Takei, K.; Bueno, E.C. **Imunoensaios – Fundamentos e Aplicações**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.



Créditos e autoria

© 2001 - MINISTÉRIO DA SAÚDE

Lilian Amaral Inocêncio
Assessora Técnica da Unidade de Laboratório do PN DST/AIDS-MS

Mirian Franchini
Coordenadora Geral do Projeto TELELAB

Autores:

Alejandro Luquetti
Eliana Furtado Moreira
Maria de Fátima Sampaio Gadelha
Yara de Miranda Gomes
Maria Lúcia Ricciotti Ribinik (pedagogia)
Maristela Arantes Marteleto (pedagogia)

Colaboradores:

Luiz Alberto Peregrino Ferreira
Maria Luiza Bazzo
Hélio Morais

Cláudia Beatriz Oliveira
Simone Monzani Vivaldini
Coordenadoras do Telelab

Assessoria Pedagógica:

Maria Lúcia Ricciotti Ribinik
Martistela Arantes Marteleto

Doença de Chagas - Triagem e diagnóstico sorológico em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde pública. - Brasília: Ministério da Saúde, Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids. 1998.

88 p.: il. (Série TELELAB)

1. Doença de Chagas - Triagem e diagnóstico sorológico em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde